

**Untersuchungen
über artspezifische Unterschiede
bei der renalen Gluconeogenese**

Frank Kornbichler

1977

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische
Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich
Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ARTSPEZIFISCHE UNTER-
SCHIEDE BEI DER RENALEN GLUCONEOGENESE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximi-
lians-Universität München

von

Frank Kornbichler

aus

Mösling

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan:	Prof.Dr.B.Vollmerhaus
Referent:	Prof.Dr.D.Giesecke
Korreferent:	Prof.Dr.D.Hegner

Tag der Promotion: 25.Februar 1977



Gewidmet meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. Allgemeiner Teil	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Renale Gluconeogenese	2
1.3. Tierartliche Unterschiede in der Gluconeogenese	7
1.4. Ziel der Untersuchungen	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Versuchsdurchführung beim Huhn	15
2.1.1. Versuchstiere	15
2.1.2. Bestimmung der renalen Gluconeogenese	15
2.1.3. Herstellung der Leberzel- lensuspension	17
2.2. Versuchsdurchführung beim Lamm	19
2.2.1. Versuchstiere	19
2.2.2. Bestimmung der renalen Gluconeogenese und der Ak- tivität der Na^+ - K^+ -sensiti- ven ATPase	21
2.3. Versuchsdurchführung beim Ferkel	25
2.3.1. Versuchstiere	25
2.3.2. Bestimmung der renalen Gluconeogenese und der Ak- tivität der Na^+ - K^+ -sensiti- ven ATPase	25

	Seite
2.4. Bestimmung der Metaboliten und des Proteins	28
2.5. Reagentien und Berechnung der Signifikanz	28
3. Ergebnisse	30
3.1. Renale Gluconeogenese beim Huhn	30
3.2. Hepatische Gluconeogenese beim Huhn	46
3.3. Renale Gluconeogenese beim Lamm	46
3.4. Renale Gluconeogenese beim Ferkel	57
4. Diskussion	61
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	76

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung

Die Gluconeogenese rückte in das besondere Interesse der Biochemie, als man in der Mitte dieses Jahrhunderts Hinweise dafür erhielt, daß dieser Stoffwechselweg nicht als einfache Umkehrung der Glykolyse zu betrachten ist. In den folgenden Jahren wurden eine Reihe von Enzymen nachgewiesen, die irreversibel Schritte der Gluconeogenese katalysieren. Die enzymatische Folge des gluconeogenetischen Stoffwechselweges kann heute als geklärt angesehen werden. Ein vieldiskutiertes Problem stellt aber die Regulation der Gluconeogenese dar. Die zahlreichen Ergebnisse auf diesem Gebiet deuten auf einen komplexen Regulationsmechanismus hin, in den Entwicklung, Ernährung und hormonelle Faktoren integriert sind. Bei der Durchsicht der diesbezüglichen Literatur fällt auf, daß bei den Untersuchungen über die Gluconeogenese die Ratte das am häufigsten verwendete Versuchstier darstellt, obgleich Hinweise dafür existieren, daß die bei der Ratte gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf den Menschen oder auf andere Spezies übertragen werden können. Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Regulation der Gluconeogenese bei Tierspezies (Huhn, Lamm, Ferkel), die als Nutztiere Bedeutung haben, auseinander. Für die Untersuchungen wurde die Niere als gluconeogenetisches Organ ausgewählt.

Die Membran der Nierenzelle zeichnet sich im Gegensatz zur Membran der Leberzelle dadurch aus, daß sie für Dicarbonsäuren permeabel ist. Es können daher auch Substrate aus dem Citratzyklus hinsichtlich ihrer gluconeogenetischen Kapazität in der Niere untersucht werden.

1.2. Renale Gluconeogenese

Noch bevor die Wege des Kohlenhydratstoffwechsels im einzelnen bekannt waren, hatte PINCUSSEN (51) die Beobachtung gemacht, daß frisches Nierengewebe Milchsäure bildet. Dabei fiel ihm auf, daß die Milchsäurebildung zunächst im Nierenmark und erst später auch in der Nierenrinde auftrat. Damit wurde erstmals neben der morphologischen Differenzierung auch ein metabolischer Unterschied zwischen Rinde und Mark festgestellt. In eingehenderen Untersuchungen konnte dann belegt werden, daß die Glykolyse in der Rinde nur unter Anaerobiose abläuft, während das innere Mark auch unter aeroben Bedingungen größere Mengen an Lactat bildet. Eine Besonderheit des Kohlenhydratstoffwechsels wurde von BENOY und ELLIOTT (7) aufgezeigt. Bei ihren Untersuchungen über die Metabolisierung von Lactat und Pyruvat machten sie die Beobachtung, daß der O_2 -Verbrauch nicht dem oxidativen Umsatz entsprach (14). Ihre Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß die Niere in der Lage ist, aus Pyruvat und Lactat

Glucose aufzubauen (7). Mit dieser Entdeckung war gleichzeitig die Frage nach der physiologischen Bedeutung der renalen Gluconeogenese aufgeworfen. Bezogen auf den Proteingehalt entspricht die renale Gluconeogeneserate in etwa der hepatischen (15, 49, 52). Bezieht man die von beiden Organen mögliche Ausbeute der Gluconeogenese auf das Gesamtgewicht von Niere und Leber, so kann die Niere nur etwa 6-15% (8, 37, 47) der von der Leber produzierten Menge bilden. Der renalen Gluconeogenese dürfte demnach bei der Versorgung des Organismus mit Glucose keine große Bedeutung zukommen. Nun war bei der Niere aufgefallen, daß nicht, wie bei der Leber, das gesamte Organ zur Gluconeogenese befähigt ist, sondern nur der Bereich der Rinde (42). Dieser Teil der Niere zeichnet sich aber durch geringe Glykolyse aus. Im Mark hingegen sind die Verhältnisse genau umgekehrt. Es gewinnt seine Energie vornehmlich über die Glykolyse; die Gluconeogenese spielt aber in diesem Bereich keine Rolle (42). Diese Befunde ließen die Vermutung aufkommen, daß die renale Gluconeogenese im Dienste der Niere steht, etwa in dem Sinne, daß die Rinde das energetische Substrat in Form von Glucose bereitstellt, das vom Mark benötigt wird. Damit wird zugleich auf funktionsgerechte Weise das Problem der Koordinierung zwischen Glykolyse und Gluconeogenese in ein und demselben Organ gelöst. In der Tat konnten mit Mikrodissektion von Nierentubuli GUDER und SCHMIDT (26)

auch nachweisen, daß innerhalb des Tubulus die Enzyme der Glykolyse und der Gluconeogenese räumlich getrennt sind.

Die Erkenntnis, daß über die renale Gluconeogenese die Kohlenhydratversorgung des Hirnenmarks gewährleistet wird, war für die Biochemie nicht befriedigend. Es blieb die Frage, ob die renale Gluconeogenese spezifische Eigenheiten gegenüber der hepatischen Gluconeogenese auszeichnet. Dabei waren bei den einzelnen Enzymschritten im gluconeogenetischen Stoffwechselweg keine Unterschiede zu beobachten. Ebenso verhielten sich die Enzyme der Gluconeogenese unter verschiedenen physiologischen Bedingungen in beiden Organen gleich. Zustände, die durch verminderten Insulinspiegel gekennzeichnet sind, wie Hunger (28), kohlenhydratarme Ernährung (38) und Diabetes mellitus (61) führten zu einer Steigerung der Gluconeogenese in Niere und Leber. Gleichsinniges Verhalten bei beiden Organen in Bezug auf die Gluconeogenese zeigte sich auch in der Stimulierung der gluconeogenetischen Enzyme durch Glucocorticoide (13, 20, 30, 34, 53), Schilddrüsenhormone (6, 34) und Wachstumshormon (34). Schließlich ist auch die Reaktion der Gluconeogenese auf Fettsäuren in beiden Organen vergleichbar (40, 59, 64, 65). So nahm deshalb KREBS noch 1963 (44) an, daß die renale Gluconeogenese eine von den Aufgaben bei der Bildung des Sekundärharns unabhängige Stoffwechselfunktion sei.

KREBS wies dann in seinen systematischen Arbei-

ten erstmals auf die Substratspezifität der renalen Gluconeogenese hin (44, 38), welche sich in erster Linie bei den Aminosäuren darstellen ließ. So waren Glutamat und Glutamin in der Niere in hohem Maße zur Gluconeogenese befähigt (49), in der Leber jedoch nur in geringem Maße (52). Alanin und Serin hingegen eigneten sich wohl in der Leber als Substrate für die Glucosebildung, nicht aber in der Niere. Auch Dicarbonsäuren wie Succinat, Malat, Fumarat und Oxalacetat zeigten nur in der Nierenrinde deutliche Gluconeogeneseraten (38, 49, 52). Glutamat und Glutamin wurde besondere Beachtung bei der NH_3 -Sekretion geschenkt.

Auf einen für die Niere speziellen chemischen Mechanismus der Gluconeogenese konnten 1966 GOODMAN et al. aufmerksam machen (24). Sie zeigten, daß die renale Gluconeogenese durch Erzeugung einer metabolischen Acidose erhöht, durch Induzierung einer Alkalose aber erniedrigt werden kann. Darüber hinaus wurde von den Autoren eine Relation zwischen Ionenhaushalt und Nierengluconeogenese dahingehend aufgezeigt, daß Kaliummangel mit einem Anstieg der Gluconeogenese einhergeht (24). Erniedrigung des pH-Wertes steigerte in Versuchen von KAMM et al. die renale Glucosebildung auch in vitro (35). Diese Befunde konnten an der Leber nicht erhoben werden. Deshalb schienen sie von besonderer Bedeutung für die physiologische Regulation der renalen Gluconeogenese zu sein. KAMM und CAMILL (36)

konnten dann aufzeigen, daß sich die renale Gluconeogenese beim Hunger und beim Diabetes mellitus wieder normalisierte, wenn die Acidose, die unter diesen Bedingungen auftritt, durch Alkaligaben beseitigt wird. Auf die hepatische Gluconeogenese hingegen hatte die Neutralisierung des pH-Wertes keinen Effekt. In der Niere führt also die Beseitigung der Acidose, die beim Hunger und Diabetes auftritt, zur Normalisierung des gluconeogenetischen Geschehens, auch wenn die primären Ursachen für die Acidose fortbestehen. Diese Befunde wurden als Hinweis dafür gewertet, daß die renale Gluconeogenese im Dienste der renalen Sekretionsleistung steht.

Schließlich ist bekannt, daß Glucagon und Insulin keinen Einfluß auf die renale Glucosebildung ausüben (49). Dieser Befund ist aber nicht spezifisch für die Gluconeogenese, denn auch bei anderen renalen Stoffwechselprozessen konnte man bislang keinen deutlichen Insulin- bzw. Glucagoneffekt wahrnehmen.

Einen interessanten Aspekt der Regulierung der renalen Gluconeogenese konnten auch FRIEDRICHS und SCHONER (19) sowie FÜLGRAFF (21) aufzeigen. Aus ihren Versuchen geht hervor, daß durch Hemmung des aktiven Natriumtransportes Energie für die Gluconeogenese freigestellt werden kann. In diesem Zusammenhang scheint die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -sensitive ATPase eine besondere Rolle zu spielen. Dieses Enzym katalysiert die hydro-

lytische Spaltung von ATP. Die Energie aus dieser Reaktion verwertet die Tubuluszelle der Niere für den aktiven Transport von Na^+ - und K^+ -Ionen (54), sowie indirekt von Aminosäuren (18) und Monosacchariden (1). Darüber hinaus beeinflußt das Enzym offensichtlich auch Stoffwechselvorgänge, die nicht direkt mit dem Transportgeschehen zusammenhängen, wie z.B. die renale Gluconeogenese.

1.3. Tierartliche Unterschiede in der Gluconeogenese

Speziesbedingten Unterschieden in der Gluconeogenese wurde lange Zeit keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Erst die Arbeiten von SÖLING (57,58) machten deutlich, daß die Kenntnisse, die an der Ratte gewonnen wurden, nur bedingt auf andere Tierarten oder den Menschen übertragen werden können. So erhöhten Fettsäuren bei der Ratte die Gluconeogenese aus Lactat wie aus Pyruvat (40, 57, 59, 64). Bei Taube, Meerschweinchen und Schwein bewirkten Fettsäuren nur im Falle von Pyruvat eine Steigerung der Gluconeogenese (29, 57, 58). Die Gluconeogenese aus Lactat nimmt bei diesen Spezies unter dem Einfluß von Fettsäuren nicht zu. Beim Meerschweinchen und beim Schwein war unter diesen Umständen sogar eine Hemmung der Gluconeogenese aus Lactat zu beobachten. Weitere tierartliche Unterschiede ergaben sich beim Einsatz von Äthanol. In der perfundierten Rattenle-

ber und in Leberschnitten der Maus verursachte Äthanol keine Steigerung der Gluconeogenese, wenn Pyruvat als Substrat eingesetzt wurde (41, 43). Hingegen nahm die Gluconeogenese aus Pyruvat in der perfundierten Tauben- und Meerschweinchenleber unter dem Einfluß von Äthanol signifikant zu (57, 58).

Schließlich zeigte auch Aminooxyacetat, ein Hemmer der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, speziesbedingte unterschiedliche Auswirkungen auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat (2, 46, 67). Bei der Ratte und beim Meerschweinchen hemmte Aminooxyacetat die Gluconeogenese aus Lactat, bei der Taube hingegen verursachte dieselbe Substanz eine Hemmung der Gluconeogenese aus Pyruvat. Für diese Befunde konnte eine hinreichende Erklärung gefunden werden, die die Kompartimentierung der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pep CK) als Ursache speziesbedingter Unterschiede in der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat ausweist (57). Die gluconeogenetischen Wege aus Lactat und Pyruvat bei mitochondrial bzw. cytoplasmatisch lokalisierter Pep CK sind in Abbildung 1a bzw. 1b aufgezeichnet. Die Abbildungen sind in modifizierter Form der Arbeit von LONGSHAW et al. (46) entnommen. Bei der Abbildung 1b wird von der Voraussetzung ausgegangen, daß Oxalacetat über Aspartat in das Cytoplasma transportiert wird, wenn Lactat das

Abb.1a : Weg der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat bei Ausbildung der Pep CK im Mitochondrium [nach LONGSHAW et al. (46)]

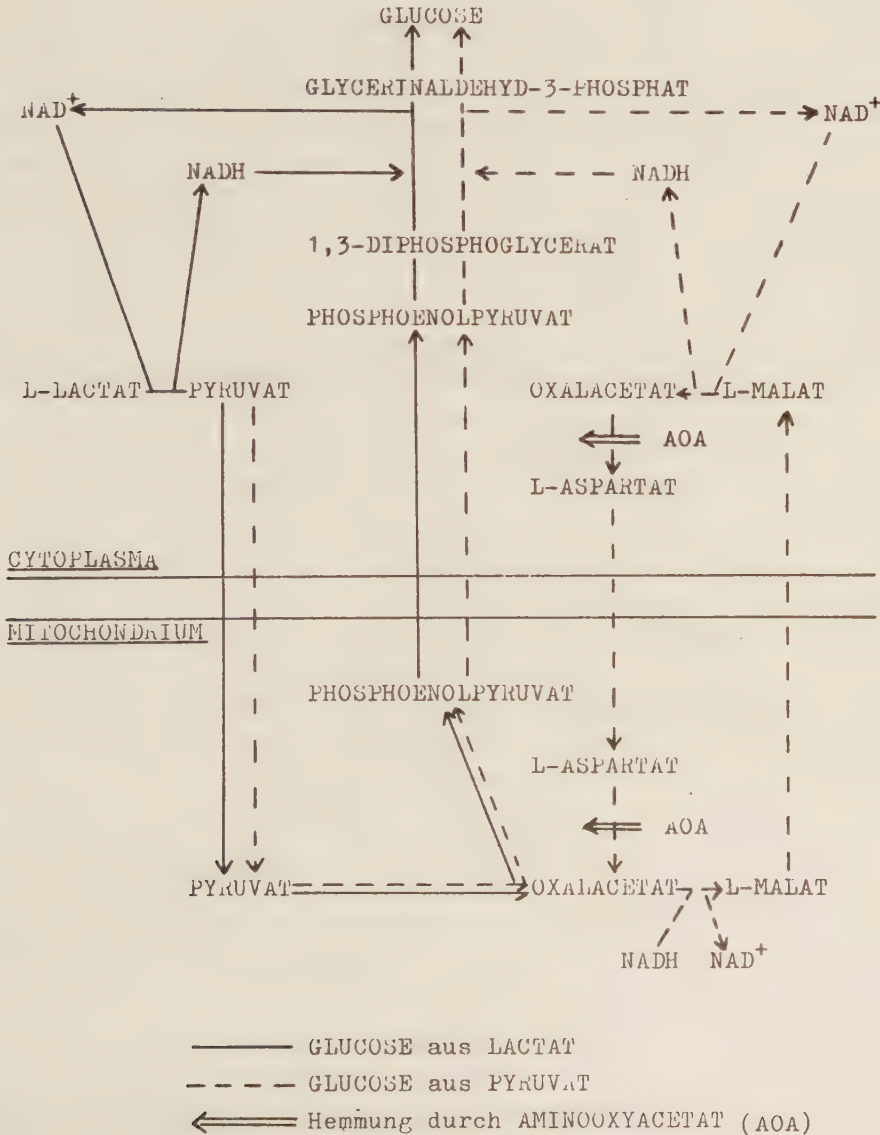
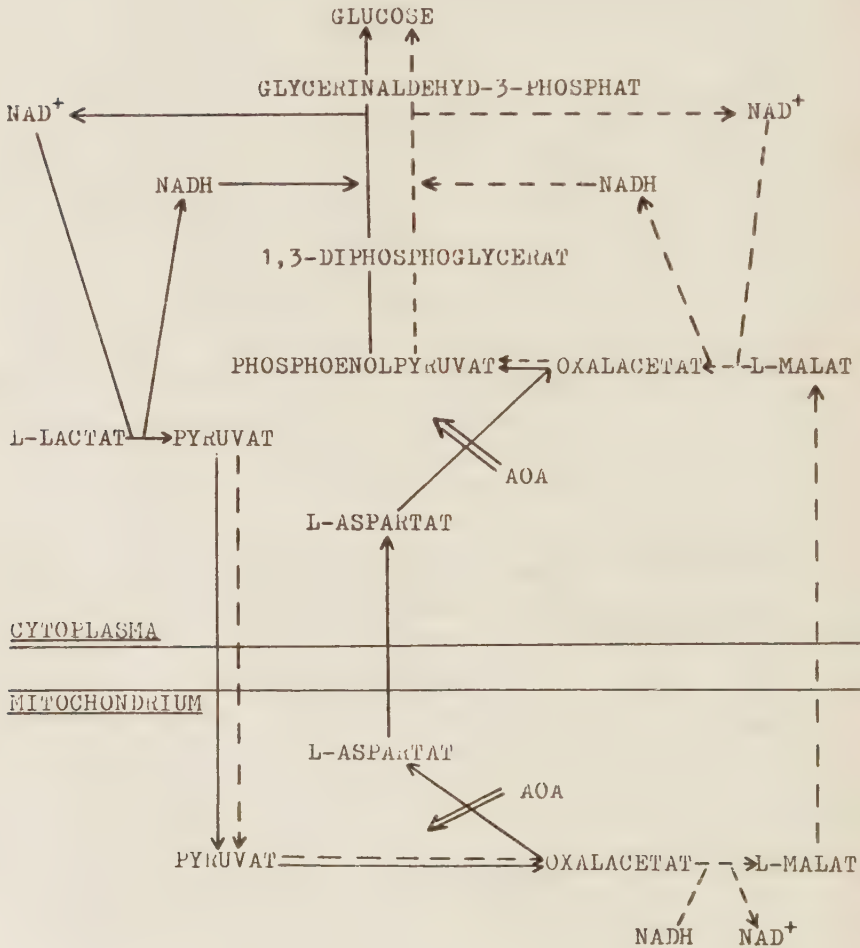


Abb.1b : Weg der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat bei Ausbildung der 1ep CK im Cytoplasma [nach LONGSHAW et al. (46)]



gluconeogenetische Substrat darstellt, und über Malat, wenn Pyruvat das gluconeogenetische Substrat bildet. Dieser unterschiedliche Weg der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat ist deswegen erforderlich, weil im Falle von Pyruvat gleichzeitig mit dem Oxalacetat Reduktionsäquivalente in das Cytoplasma transportiert werden müssen, die bei der Reduktion von 1,3-Diphosphoglycerat benötigt werden. Der Transport von Wasserstoff aus den Mitochondrien erübrigt sich, wenn Lactat das gluconeogenetische Substrat darstellt, da bei dessen Oxidation zum Pyruvat die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten gewährleistet wird.

Hemmt man nun die Transaminierung von Oxalacetat, so sollte bei einer cytoplasmatisch lokalisierten Pep CK nach den Aufzeichnungen in Abbildung 1b davon nur die Gluconeogenese aus Lactat betroffen sein. Bei Tieren mit mitochondrial ausgebildeter Pep CK (vgl. Abb.1a) ist für den Aufbau von Phosphoenolpyruvat ein Transport von Oxalacetat durch die Mitochondrienmembran nicht erforderlich. Man nimmt aber an, daß in dem Falle, wo Pyruvat das gluconeogenetische Substrat darstellt, die Reduktionsäquivalente ebenfalls über Malat in das Cytoplasma gelangen. Um aber eine Verarmung an Oxalacetat im Mitochondrium zu verhindern, soll nach der Oxidation von Malat das entstehende Oxalacetat wieder transaminiert und in dieser Form wieder den Mitochondrien zugeführt werden. Im Einklang mit dieser Vorstellung steht der Befund, daß bei

der Taube, die eine mitochondrial ausgebildete Pep CK aufweist, Aminooxyacetat nur die Gluconeogenese aus Pyruvat hemmt.

Eine zufriedenstellende Erklärung der speziessbedingten Unterschiede, die sich unter dem Einfluß von Äthanol und von Fettsäuren ergaben, ist mit dem derzeitigen Stand der Kenntnisse nicht möglich. Es wird aber als wahrscheinlich angenommen, daß die Lokalisierung der Pep CK in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Rolle spielt (2).

Schließlich gibt es auch bezüglich der Ontogenese im Hinblick auf das gluconeogenetische Geschehen erhebliche tierartliche Unterschiede. So ist nur beim Vogel die Gluconeogenese pränatal maximal ausgebildet. Die meisten gluconeogenetischen Schlüsselenzyme erreichen bereits zu dieser Zeit Werte, die denen von erwachsenen Tieren entsprechen (48). Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß auf Grund der geringen Kohlenhydratreserven im Ei die endogene Versorgung mit Glucose lebensnotwendig ist. Bei den Säugetieren hingegen gewinnt die Gluconeogenese erst postnatal zunehmend an Bedeutung. Lediglich die Wiederkäuer weisen bereits vor der Geburt gluconeogenetische Kapazität auf, die jedoch noch nicht sehr ausgeprägt ist (5).

Die Gluconeogenese der Wiederkäuer zeichnet sich gegenüber Huhn und Schwein auch noch durch weitere charakteristische Merkmale aus.

Da die über das Futter aufgenommenen Kohlenhydrate durch die Pansenflora abgebaut werden, sind die Wiederkäuer auf die endogene Neubildung von Glucose angewiesen. Beim Huhn und beim Schwein hingegen ist die endogene Versorgung mit Glucose nur unter besonderen Umständen, wie z.B. im Hungerzustand oder bei Diabetes, von Bedeutung. Die Gluconeogenese gewinnt demzufolge bei den Wiederkäuern erst mit der Ausbildung des Vormagens ihre funktionelle Bedeutung. Kurzkettige Fettsäuren stellen dann auch die wichtigsten gluconeogenetischen Substrate dar. Dabei kommt der Propionsäure eine gewichtige Rolle zu. Etwa 50% der in der Leber gebildeten Glucose wird aus Propionat aufgebaut (4) . Es wird über Succinyl-CoA in den Weg der Gluconeogenese eingeschleußt.

1.4. Ziel der Untersuchungen

Da der hepatischen Gluconeogenese eine größere Bedeutung als der renalen Gluconeogenese zukommt, wurden die hauptsächlichen Kenntnisse über die tierartlichen Unterschiede in der Gluconeogenese aus Untersuchungen an der Leber gewonnen. Ob artspezifische Eigenarten, ähnlich wie in der Leber, auch für die Niere gelten, darüber sind in der Literatur nur wenige Befunde angeführt, so daß immer noch die

Verhältnisse an der Rattenniere als allgemein-gültig angesehen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, aufzuzeigen, wie bei anderen Tierarten artspezifische Eigenheiten auf die renale Gluconeogenese Einfluß nehmen. Für diese Untersuchungen wurden daher Tierarten ausgewählt, deren zellbiochemische und ontogenetische Besonderheiten Auswirkungen auf die Gluconeogenese erwarten lassen. Unter diesem Aspekt wurden Lamm und Huhn ausgewählt. In geringerem Umfang wurden auch Versuche am Ferkel durchgeführt. Lamm und Ferkel unterscheiden sich zellbiochemisch vom Huhn dadurch, daß die Pep CK bei ersteren auf das Cytoplasma und die Mitochondrien verteilt ist (29, 56), während beim Huhn dieses Schlüsselenzym ausschließlich in den Mitochondrien vorkommt (16, 23, 50, 62). Des weiteren unterscheidet sich das Huhn von Ferkel und Lamm dadurch, daß bei ihm ab dem ersten Lebenstag die Gluconeogenese voll entwickelt ist. Schließlich ist beim Lamm mit der Ausbildung des Vormagensystems eine Umstellung im pH-Wert des Harns verbunden, die sich ebenfalls auf die Gluconeogenese auswirken sollte.

2.Material und Methoden

2.1.Versuchsdurchführung beim Huhn

2.1.1.Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche Tiere der Rasse "Weißes Leghorn" im Alter von 1-7 Tagen sowie von 5-10 Wochen verwendet. Sie wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub bei München bezogen. Gefüttert wurden handelsübliches Kükenalleinfutter bzw. Junghennenalleinfutter (Fa. DR. ZENTZ & CO. Feldmochinger Kraftfutter). Wasser und Futter konnten ad libitum aufgenommen werden.

2.1.2.Bestimmung der renalen Gluconeogenese

Die Untersuchungen wurden an isolierten Nierentubuli durchgeführt. Die Isolierung erfolgte nach der Beschreibung von GUDER (25). Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach mechanischer Betäubung des Huhnes wurde die Niere rasch entnommen, in Stücke geschnitten und in mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begastem Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Sodann wurden die zerkleinerten Teile durch ein feines Plastiksieb gedrückt und der dadurch erhaltene Gewebsbrei noch zweimal mit Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Nun wurde 1g Nierenbrei mit 10ml Puffer versetzt, der 100 Einheiten Kollagenase enthielt. und circa 2

Minuten mit Carbogen begast. Anschließend wurde das Gemisch 45 Minuten lang im Wasserbad im fest verschlossenen Gefäß bei 37°C geschüttelt (Schüttelfrequenz: 100/min). Danach wurde der proteolytische Prozeß durch Zugabe derselben Menge gekühlten Krebs-Henseleit-Puffers, wie sie im verschlossenen Gefäß vorhanden war, gestoppt, und die groben Partikel wurden durch Dekantieren abgetrennt. Der Überstand wurde 30 Sekunden bei 1400xg zentrifugiert. Der hierbei erhaltene Niederschlag, der die Tubuli enthielt, wurde durch zwei weitere Zentrifugationen von Kollagenaseresten freigewaschen. Der Niederschlag wurde dabei nach der ersten Zentrifugation in 10ml und nach der zweiten Zentrifugation in 1-2ml Puffer aufgenommen.

Nun wurde die gluconeogenetische Aktivität der Tubulisuspension geprüft. Die Inkubation fand in 15ml Plastikgefäßen mit Schraubverschluß statt. 1ml Inkubationsmedium enthielt 0,1ml Tubulisuspension, 0,8ml Krebs-Henseleit-Puffer und 0,1ml Substratlösung. Beim Einsatz mehrerer Substrate verringerte sich entsprechend die Menge der Pufferzugabe. Das Inkubationsgemisch wurde im Eisbad 15 Sekunden mit Carbogen begast und anschließend fest verschlossen, worauf sich die Inkubation unter leichtem Schütteln (Schüttelfrequenz: 75/min) bei 37°C im Wasserbad anschloß. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2ml 30%-iger HClO_4 gestoppt, die denaturierte Tubulisuspension bei 10 000xg ab-

zentrifugiert und in dem mit K_2CO_3 neutralisierten Überstand die Glucosekonzentration mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt (9).

2.1.3. Herstellung der Leberzellensuspension

Die Herstellung der Leberzellensuspension erfolgte nach einer Methode, die von WITTMANN und WEIGL (66) für die Isolierung von Leberzellen embryonaler Küken ausgearbeitet worden war. Bei dieser Methode wird im Gegensatz zu den Methoden, die üblicherweise zur Abtrennung von Hepatozyten eingesetzt werden (10), das Organ nicht mit Kollagenaselösung perfundiert. Im folgenden wird die Präparation der Leberzellensuspension beschrieben: Um ein weitgehendes Ausbluten des Tierkörpers zu erreichen, wurde das Huhn dekapitiert und nach Eröffnung der Leibeshöhle die Leber via Pfortader mit Krebs-Henseleit-Puffer so lange durchspült, bis eine Aufhellung des Organs eintrat. Anschließend wurde die Leber in kleine Stücke geschnitten und diese wurden wiederholt mit Pufferlösung gewaschen. Die Leberstücke wurden dann durch ein engmaschiges Kunststoffsieb gedrückt und der Leberbrei in Krebs-Henseleit-Puffer aufgefangen. Danach wurde das Gemisch in eine Krebs-Henseleit-Puffer enthaltende Plastik-

flasche (pro g Leber 10ml Puffer) verbracht, mit Kollagenase (1400 Einheiten pro g Leber) versetzt und circa 2 Minuten lang mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast. Die fest verschlossene Plastikflasche wurde hierauf 60 Minuten lang bei $37^{\circ}C$ im Wasserbad geschüttelt (Schüttelfrequenz: 100/min). Im Anschluß daran wurde, ähnlich wie bei der Herstellung der Nierentubuli, der proteolytische Prozeß durch Zugabe derselben Menge gekühlten Puffers gestoppt und die groben Teile wurden durch Dekantieren abgetrennt. Der Überstand wurde sodann bei 500xg (1 Minute) zentrifugiert und der Niederschlag in 10ml Puffer suspendiert. Um die verbliebene Kollagenase zu entfernen, wurde die Suspension noch zweimal bei 500xg zentrifugiert, wobei der Niederschlag nach der ersten Zentrifugation in 10ml Puffer und nach der zweiten Zentrifugation in 1-2ml Puffer aufgenommen wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Hepatozyten waren gegen Trypanblau weitgehend intakt (85%) und zeigten bei Zugabe von Succinat keine zusätzliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs, der mit der Clark-Elektrode bestimmt wurde. Im mikroskopischen Bild zeigte sich eine deutliche Hepatozytenanreicherung, die weitgehend frei von Erythrozyten war.

Die Inkubation der Leberzellensuspension und die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgten auf die gleiche Weise, wie sie bei der Bestimmung der renalen Gluconeogenese (vgl. 2.1.2.) ausgeführt wurde.

2.2.Versuchsdurchführung beim Lamm

2.2.1.Versuchstiere

Bei dieser Spezies stand neben den Aspekten, die beim Huhn Gegenstand der Untersuchungen über die Gluconeogenese waren, die Frage im Vordergrund, ob sich beim Wiederkäuer die Ausbildung des Vormagensystems auf die renale Gluconeogenese auswirkt. Zur Klärung dieser Frage ist Voraussetzung, daß bei den Versuchstieren altersabhängige Einflüsse eliminiert werden. Es mußten daher Tiere verglichen werden, die sich im Alter entsprachen, aber in der Vormagenentwicklung Unterschiede aufwiesen. Dieses Ziel wurde durch unterschiedliche Fütterung gleichaltriger Tiere angestrebt: Die Lämmer wurden nach dem Absetzen vom Mutterschaf in den ersten vier Wochen am Fütterungsautomaten mit Milchaustauschertränke ernährt (Biofix L, s. Tab.1a). Danach erfolgte eine Aufteilung der Tiere in zwei nach Gewicht und Geschlecht möglichst gleiche Gruppen. Bei der einen Gruppe wurde die Entwicklung des Vormagensystems durch ausschließliche Ernährung mit Milchaustauschertränke gehemmt (M-Lämmer), der anderen Gruppe wurde Heu und Kraftfutter (HK-Lämmer) ad libitum angeboten (s. Tab.1b). Durch allmähliche Reduzierung der Milchaustauschertränke wurde diese Gruppe im Alter von circa 6 Wochen ausschließlich auf Heu und Kraftfutter um-

Tab.1a : Zusammensetzung des Milchaustauschers
(Biofix L ¹)

Magermilchpulver	57,5
Fett	30,0
Süßmolkenpulver	2,5
teilverzuckerte Maisquellstärke	8,0
wasserfreie Kieselsäure	1,0
(Fließhilfstoff)	
Mineralstoffvormischung	0,7
Antibiotikavormischung	0,2
Vitaminvormischung	0,1
	100,0

Tab.1b : Zusammensetzung des Kraftfutters

Sojaschrot	33,3
Zuckerrübenschnitzel	30,8
Hafereschrot	16,7
grob gemahlenes Gerstenbrot	16,7
Vitamin-Mineralstoff-Mischung	2,5
	100,0

1) Bayerische Milchindustrie GmbH, Landshut

gestellt. Beiden Tiergruppen wurde eine Mineralsalzmischung zur freien Aufnahme angeboten. Zum Zeitpunkt der Tötung betrug das Gewicht der HK-Lämmer $27,0 \pm 4,6$ kg und das der M-Lämmer $22,3 \pm 7,6$ kg. Die Tiere waren bei der Tötung 14-16 Wochen alt.

Alle Junglämmer, die im Alter von 2-7 Tagen untersucht wurden, wurden ausschließlich mit Muttermilch ernährt. Das Gewicht dieser Junglämmer betrug zum Zeitpunkt der Schlachtung 3,6-4,4 kg.

Alle für diese Versuche verwendeten Tiere gehörten der Rasse "Merino-Landschaf" an.

Vor der Entnahme der Nieren wurden die Versuchstiere mit Rompun^R (1,0 mg/kg KGW) und Keta-
nest^R (2,5 mg/kg KGW) narkotisiert.

2.2.2. Bestimmung der renalen Gluconeogenese und der Aktivität der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase

Die Bestimmung der renalen Gluconeogenese wurde, wie beim Huhn beschrieben, durchgeführt(vgl.2.1.2.) Der einzige Unterschied bestand darin, daß bei den Lämmern die Tubuli aus der Rinde isoliert wurden.

Die Aktivität der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase wurde in der homogenisierten Nierenrinde bestimmt. Dem

Verfahren liegt die Methode von CHARNEY et al. (11) zugrunde. Bei diesem Verfahren dient als Maß für die Aktivität das durch die Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase aus ATP (Konzentration: 4 mM) freigesetzte Phosphat. Für die Aktivitätsmessung wurde das Organ folgendermaßen aufbereitet: Von Nieren frisch geschlachteter Schafe wurde die Rinde abgetrennt und nach grober Zerkleinerung durch ein Plastiksieb gedrückt. Der Gewebsbrei wurde in einem gekühlten Puffer (pH 7,4) suspendiert, der folgende Zusammensetzung aufwies: 6 mM Na-EDTA, 20 mM Imidazol, 2,5 mM Na-Desoxycho-lat und 0,25 M Saccharose. Das Verhältnis Gewebsbrei : Pufferlösung betrug circa 1:4. Diese Suspension wurde 3 Minuten lang bei 5000xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde dann noch einmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der verbliebene Nierenbrei mit dem gleichen Puffer im Verhältnis von 1:8 verdünnt und in einem 10 cm³ Glashomogenisator mit Teflonstempel homogenisiert (10 Hübe). Die Aufbereitung des Organs erfolgte bei 4°C.

Das auf diese Weise gewonnene Homogenat wurde für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Die Aktivität wurde mit Hilfe von *g*-Strophantin bestimmt. Das Glycosid ist ein spezifischer Hemmer der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase. Substra-

hiert man unter standardisierten Bedingungen das in Anwesenheit von g-Strophantin freigesetzte Phosphat von der Phosphatmenge, die ohne g-Strophantin-Zusatz erreicht wird, so ist die Differenz ein Maß für die Aktivität der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase. Die in Anwesenheit von g-Strophantin ablaufende Hydrolyse des ATP wird durch die Mg^{++} -ATPase katalysiert, so daß gleichzeitig mit der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase auch die Mg^{++} -sensitive ATPase bestimmt wird. Das Phosphat wurde nach der Methode von FISKE und SUBBA ROW (17) im enteiweißten Inkubationsmedium bestimmt. Für die Optimierung der Aktivitätsbestimmung der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase waren zunächst wichtige Parameter festzulegen, wie z.B. Na^+/K^+ -Verhältnis, optimaler pH-Wert, Inaktivierung durch g-Strophantin und Inkubationszeit.

Das Enzym entfaltete seine höchste Aktivität bei einem Na^+/K^+ -Ionenverhältnis (120 mM NaCl, 20 mM KCl) von 6:1. Bei einem Verhältnis der Na^+/K^+ -Ionen von 3:1 bzw. 9:1 erreichte das Enzym nur 90% bzw. 86% der optimalen Aktivität. Für die Mg^{++} -ATPase war eine 6 mM MgCl_2 -Lösung optimal. Beim Einsatz von 2 mM Mg^{++} -Ionen bzw. 10 mM Mg^{++} -Ionen verringerten sich die Werte um 16% bzw. um 30%, bezogen auf die Werte, die bei 6 mM Mg^{++} -Ionenkonzentration erreicht

wurden. Außerdem zeigte die Aktivität der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase eine pH-Abhängigkeit, die aus der Abbildung 2 zu ersehen ist. Bei dieser Abbildung wurde der optimale Wert von pH 7,4 gleich 100% gesetzt.

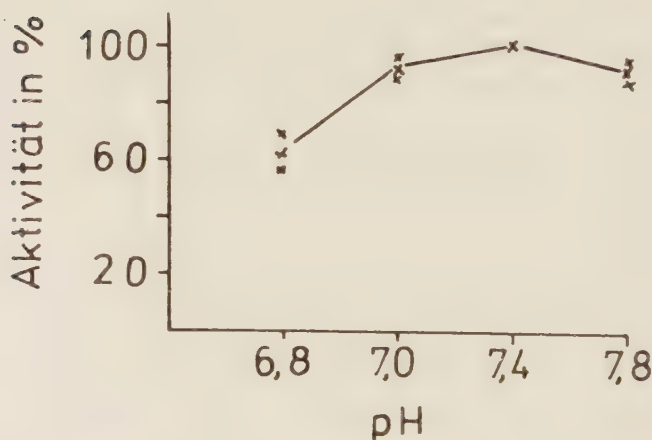


Abb. 2: Abhängigkeit der Aktivität der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase vom pH-Wert. Die Aktivität bei pH-Wert 7,4 wurde auf 100% festgesetzt.

Das Enzym wurde bei g-Strophantin-Konzentrationen von 1mM und 0,1 mM jeweils gleichermaßen gehemmt. In den Hauptversuchen wurde g-Strophantin zur Bestimmung der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase in einer Konzentration von 0,1 mM verwendet.

Wurden die optimalen Bedingungen des Na^+/K^+ -Verhältnisses, der Mg^{++} -Konzentration, sowie des pH-Wertes eingehalten, so zeigte die Aktivitätskurve des Transportenzym bis zu 8 Minuten (vgl. Abb.3) und bis zu 0,05 ml Homogenat (vgl. Abb.4) einen linearen Verlauf. Für die Hauptversuche wurden 0,05 ml Homogenat eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion anschließend mit ATP (4 mM) gestartet. Nach 8 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Trichloressigsäure (5%) gestoppt.

2.3.Versuchsdurchführung beim Ferkel

2.3.1.Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden 2-4 Wochen alte Ferkel der Rasse "Deutsche Landrasse" verwendet. Sie wurden in herkömmlicher Haltung am Mutterschwein ernährt.

2.3.2.Bestimmung der renalen Gluconeogenese und der Aktivität der Na^+/K^+ -sensitiven ATPase

Die Bestimmung der Gluconeogenese erfolgte auf die gleiche Weise wie beim Lamm. Vorversuche zeigten, daß bei Einhalten der Parameter (eingesetzte Homogenatmenge, Inkubationszeit, g-

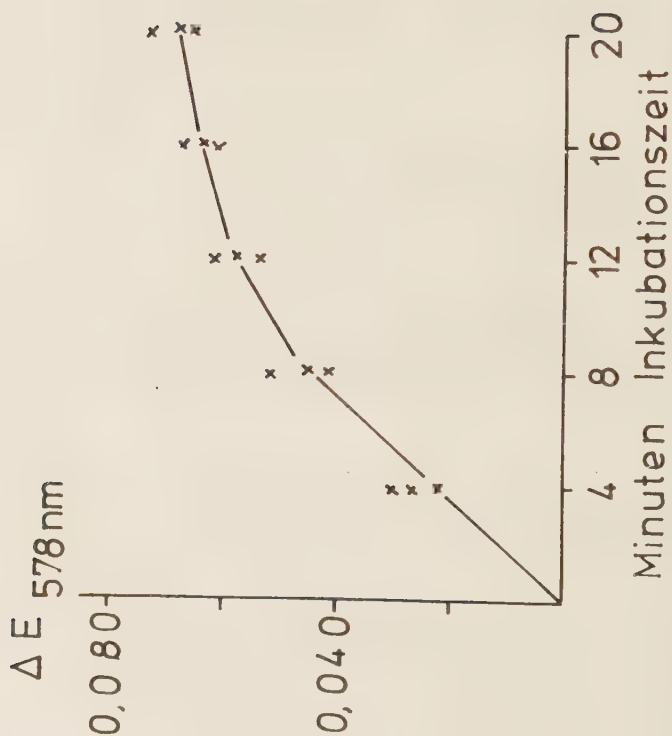


Abb. 3 : Abhängigkeit der Aktivität der $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -sensitiven ATPase von der Inkubationszeit. Als Meßgröße diente das freigesetzte Phosphat, das mit Natriummolybdat einen Farbkomplex bildet.

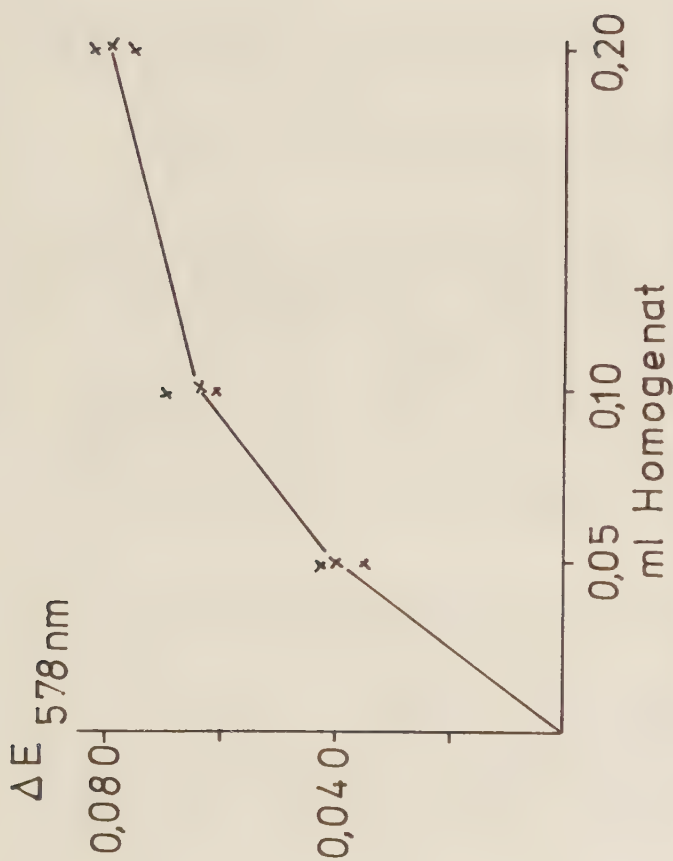


Abb. 4 : Abhängigkeit der Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -sensitiven ATPase von der eingesetzten Homogenatmenge. Als Meßgröße diente das freigesetzte Phosphat, das mit Natriummolybdat einen Farbkomplex bildet.

Strophantin-Konzentration), wie sie beim Lamm ermittelt wurden, auch bei der Bestimmung der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase maximale Aktivitätswerte erreicht wurden. Die Aktivitätsbestimmung des Transportenzym wurde daher wie beim Lamm durchgeführt.

2.4. Bestimmung der Metaboliten und des Proteins

Lactat, Pyruvat und ATP wurden in dem enteiweißten Überstand, der auch zur Bestimmung der Glucosekonzentration eingesetzt wurde, ermittelt.

Lactat bzw. Pyruvat wurden nach der Methode von CZOK und LAMPRECHT (12) bzw. HOHORST (31), ATP nach der Beschreibung von LAMPRECHT und TRAUTSCHOLD (45) bestimmt.

Protein wurde nach einer modifizierten Biuret-Methode bestimmt. Die Modifikation bestand darin, daß die lipoiden Substanzen vor der Fällung mit Trichloressigsäure mit Dioxan extrahiert wurden.

2.5. Reagentien und Berechnung der Signifikanz

Die Enzyme und Coenzyme wurden von der Firma BOEHRINGER, Mannheim bezogen.

Kollagenase lieferte die Firma SIGMA, St. Louis (USA), die übrigen Reagentien die Firma MERCK AG, Darmstadt.

Ermittelte Unterschiede wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests (55) auf Signifikanz überprüft.

Die Werte, die in den Tabellen und Abbildungen angegeben sind, stellen Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung ($\pm$) dar.

3. Ergebnisse

3.1. Renale Gluconeogenese beim Huhn

Zunächst wurde die Gluconeogenese aus verschiedenen Substraten bei 1-7 Tage alten und 5-10 Wochen alten Tieren verglichen. Ein altersbedingter Unterschied war nur beim Succinat festzustellen. (vgl. Abb. 5)

Vergleicht man die Gluconeogeneserate der verschiedenen Substrate in Abbildung 5, so fällt auf, daß Lactat ein besonders ergiebiges Substrat für die Gluconeogenese darstellt. Bei den übrigen Substraten war die gluconeogenetische Ausbeute um fast 50% niedriger.

Im folgenden wurde der Unterschied in der Glucoseausbeute zwischen Lactat und Pyruvat eingehender untersucht. Zunächst wurde eine Bilanz über die umgesetzte Pyruvat- bzw. Lactatmenge erstellt. Zu diesem Zweck wurde die Pyruvat- bzw. Lactatkonzentration, die zu Beginn der Inkubation und nach 30 Minuten Inkubation vorlag, bestimmt. Parallel hierzu wurde die Zunahme der Glucose innerhalb dieses Zeitraumes ermittelt. Aus den Werten in Tabelle 2 ist zu ersehen, daß sich die Pyruvatmenge in wesentlich höherem Umfang während der Inkubation verringerte als die Lactatmenge, obgleich die Zunahme der Glucose im ersteren Fall geringer ausfiel. Für den Aufbau von 1 Mol Glucose waren 8,3 Mol Pyruvat, aber nur

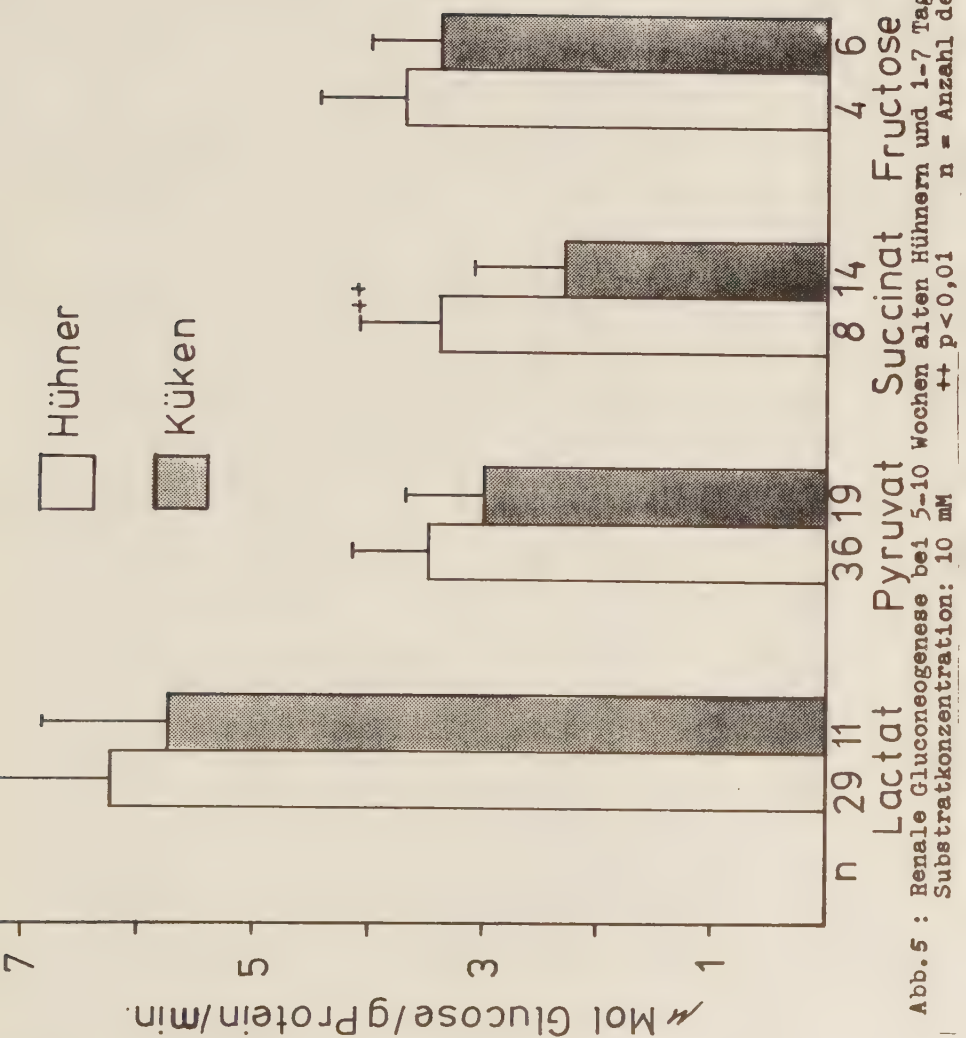


Abb.5 : Renale Gluconeogenese bei 5-10 Wochen alten Hühnern und 1-7 Tage alten Küken
 Substratkonzentration: 10 mM ++ $p < 0,01$ n = Anzahl der Versuche

Tab.2 : Veränderungen der Lactat- bzw. Pyruvatkonzentration während der Glucosebildung (30 Minuten)

Einge- setztes Substrat (10 mM)	Substratkonzentration in μ Mol		a-b(Δ S)	Glucosebildung nach 30 min in μ Mol (Δ G)	$\frac{\Delta S}{\Delta G}$	
	0 min (a)	30 min (b)			ΔS	ΔG
Lactat (n)	2488,1 $\pm$ 314,8 (5)	1958,6 $\pm$ 315,4 (5)	529,5	169,8 $\pm$ 22,5 (5)	3,1	
Pyruvat (n)	1920,8 $\pm$ 143,3 (9)	1007,6 $\pm$ 119,9 (9)	913,2	109,5 $\pm$ 15,0 (9)	8,3	

n = Anzahl der Tiere

3,1 Mol Lactat erforderlich. Betrachtet man aber die Konzentrationen, die für die maximale Gluconeogenese aus beiden Substanzen erforderlich sind, so liegt die Konzentration im Falle von Pyruvat deutlich unter der des Lactats (vgl. Abb.6).

Da sich Lactat von Pyruvat nur durch eine geringere Oxidationsstufe unterscheidet, liegt die Vermutung nahe, daß Reduktionsäquivalente die Ursache der unterschiedlichen Gluconeogeneseausbeute bilden. Eine Anhebung der Reduktionsäquivalente sollte demnach zu einer Steigerung der Gluconeogenese aus Pyruvat führen. Für derartige Versuche ist, wie aus Untersuchungen an der Leber bekannt ist, Äthanol wegen seiner steigernden Wirkung auf das cytoplasmatische Redoxpotential besonders geeignet. Bei den Versuchen wurden die Tubuli mit dem betreffenden Substrat (10 mM) und mit Äthanol (10 mM) inkubiert. Die Kontrollansätze enthielten lediglich das Substrat. Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, daß Äthanol sich unterschiedlich auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat auswirkte. Während sich die Gluconeogeneserate aus Pyruvat in Anwesenheit von Äthanol erhöhte, verringerte sich die Glucosebildung aus Lactat. Eine Erhöhung der Äthanolkonzentration auf 20 mM brachte keine weitere Steigerung der Gluconeogenese, wenn Pyru-

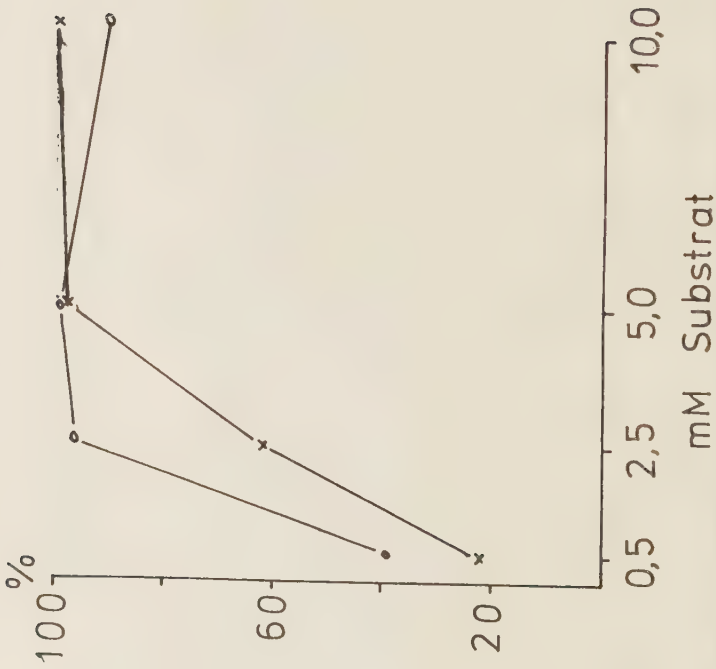


Abb. 6: Abhängigkeit der Gluconeogenese isolierter Tubuli von der Substratkonzentration
 x-x = Lactat o-o = Pyruvat
 Die maximale Glucoseausbeute wurde gleich 100% gesetzt

Tab. 3 : Einfluß von g-Strophantin und Äthanol auf die renale Gluconeogenese beim Huhn

Substrat (10 mM)	Kontrolle	g-Strophantin (0,1 mM)	Äthanol (10 mM)	g-Strophantin(0,1 mM) u. Äthanol (10 mM)
	Mol Glucose / g Protein / min			
Lactat (n)	5,73 $\pm$ 1,38 (8)	2,66 $\pm$ 0,63 ⁺⁺⁺ (8)	3,81 $\pm$ 0,80 ⁺⁺ (8)	
Pyruvat (n)	3,03 $\pm$ 0,81 (19)	3,98 $\pm$ 0,93 ⁺⁺ (19)	4,44 $\pm$ 1,04 ⁺⁺⁺ (18)	5,25 $\pm$ 1,57 ⁺ (6)
Succinat (n)	3,40 $\pm$ 0,69 (8)	0,57 $\pm$ 0,29 ⁺⁺⁺ (5)		
Fructose (n)	3,69 $\pm$ 0,78 (4)	0,54 $\pm$ 0,44 ⁺⁺⁺ (4)		

+ p < 0,05; ++ p < 0,01; +++ p < 0,001

n = Anzahl der Tiere

vat als gluconeogenetisches Substrat eingesetzt wurde.

Ähnlich wie Äthanol wirkte sich auch g-Strophantin unterschiedlich auf die Gluconeogeneserate aus Lactat und Pyruvat aus. Auch hier wurde im Falle von Lactat eine Hemmung, und im Falle von Pyruvat eine Steigerung der Glucosebildung beobachtet. Der Tabelle 3 ist außerdem zu entnehmen, daß die Steigerung der Gluconeogenese aus Pyruvat durch Äthanol und g-Strophantin sich annähernd additiv verhält, und daß hierbei mit Pyruvat eine Glucoseproduktion erreicht wird, die in etwa dem Wert des Lactats ohne weitere Zusätze entspricht. Hemmend wirkte sich g-Strophantin auch auf die Gluconeogenese aus Succinat und Fructose aus, und zwar um ein vielfaches stärker als bei Lactat und Pyruvat.

Im folgenden wurde untersucht, ob sich Äthanol bzw. g-Strophantin auch auf die Lactat- und Pyruvatkonzentrationen des Inkubationsansatzes verschieden auswirkt. Lactat und Pyruvat wurden in dem Überstand, der auch für die Glucosemessung eingesetzt wurde, bestimmt. In Tabelle 4 sind die Lactat- bzw. Pyruvatkonzentrationen aufgezeichnet, die nach 30 Minuten Inkubation im enteiweißten Medium vorlagen. Äthanol erhöhte die Lactatkonzentration, wenn Pyruvat das

Tab.4 : Einfluß von g-Strophantin und Äthanol auf die Lactat- bzw. Pyruvat-
konzentration in Nierentubuli während der Inkubation (30 Minuten)
beim Huhn

Substrat (10 mM)	Kontrolle	g-Strophantin (0,1 mM)	Äthanol (10 mM)
	μMol Lactat / g Protein		
Lactat (n)	1958,6±315,4 (5)	1922,8±348,4 (5)	2027,9±353,4 (5)
Pyruvat (n)	212,2±36,0 (6)	207,0±32,7 (5)	332,5±32,5 ⁺⁺⁺ (6)
Substrat (10 mM)	μMol Pyruvat / g Protein		
Lactat (n)	153,9±39,7 (7)	79,7±12,3 ⁺⁺ (7)	87,2±21,1 ⁺⁺ (7)
Pyruvat (n)	1007,6±119,9 (9)	1051,9±114,2 (5)	

++ p<0,01; +++ p<0,001

n = Anzahl der Tiere

gluconeogenetische Substrat bildete. Wurde hingegen Lactat im Inkubationsmedium vorgelegt, so verringerte Äthanol die Konzentration von Pyruvat. Die Anwesenheit von g-Strophantin hemmte, ähnlich wie Äthanol, den Anstieg von Pyruvat, wenn Lactat das gluconeogenetische Substrat darstellte. Es hatte im Gegensatz zu Äthanol aber keine Steigerung des Lactatspiegels zur Folge, wenn Pyruvat als gluconeogenetisches Substrat eingesetzt wurde.

Da g-Strophantin in den ATP-Umsatz eingreift, wurde untersucht, ob sich die Anwesenheit von g-Strophantin im Inkubationsansatz bei Verwendung von Lactat bzw. Pyruvat als Substrat unterschiedlich auf die ATP-Konzentration der Tubuli auswirkt. Die Ergebnisse ergaben keinen Hinweis für eine substratspezifische Veränderung des ATP-Gehaltes durch g-Strophantin (vgl. Tab.5).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Auswirkungen von Oxalacetat und Malat auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat untersucht. Beide Substanzen unterscheiden sich durch ihre Oxidationsstufe. Außerdem ist die Mitochondrienmembran für Oxalacetat im Gegensatz zu Malat nicht permeabel. Da beide Metaboliten selbst gluconeogenetische Substrate darstellen, wurden sie in submaximaler

Tab.5 : Einfluß von g-Strophantin auf die
ATP-Konzentration der Nierentubuli
während der Inkubation (30 Minuten)
beim Huhn

Substrat (10 ml)	Kontrolle	g-Strophantin (0,1 mM)
	$\mu\text{Mol ATP} / \text{g Protein}$	
- (n)	6,16 $\pm$ 1,71 (7)	
Pyruvat (n)	7,84 $\pm$ 1,79 (7)	7,46 $\pm$ 1,48 (7)
Lactat (n)	8,45 $\pm$ 1,74 (7)	8,54 $\pm$ 1,81 (7)

n = Anzahl der Tiere

Konzentration eingesetzt, um nicht maßgeblich an der Gluconeogenese beteiligt zu sein. Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, wirkte sich die Anwesenheit von Oxalacetat unterschiedlich auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat aus. Während im Falle von Lactat Oxalacetat eine geringe, aber dennoch signifikante Zunahme der Gluconeogenese bewirkte, hatte beim Pyruvat die Anwesenheit von Oxalacetat eine deutliche Abnahme der Gluconeogeneserate zur Folge. Die absoluten Werte der Gluconeogenese aus Lactat plus Oxalacetat entsprechen annähernd den additiven Werten, die erreicht wurden, wenn Lactat und Oxalacetat isoliert eingesetzt wurden. Hingegen entspricht der absolute Wert aus Pyruvat plus Oxalacetat in etwa dem Wert, den Oxalacetat alleine erbrachte. Wurde nun zum Ansatz neben Pyruvat und Oxalacetat auch noch Athanol hinzugegeben, so war der hemmende Effekt von Oxalacetat auf die Gluconeogenese nicht mehr zu beobachten. Es trat sogar eine geringgradige Zunahme gegenüber den Werten aus Pyruvat ein, die aber statistisch nicht gesichert werden konnte. Wurde aber anstatt Oxalacetat Malat dem Inkubationsansatz zusätzlich zu Pyruvat zugegeben, so war unter diesen Bedingungen keine Hemmung der Gluconeogenese festzustellen. Die Anwesenheit von Oxalacetat verhinderte außerdem den Übergang von Pyruvat zum Lactat in den Fällen, in de-

Tab.6 : Einfluß von Oxalacetat, Äthanol und Malat auf die renale Glucose-
neogenese aus Lactat und Pyruvat beim Huhn

Substrat	Kontrolle	Oxalacetat (1 mM)	Oxalacetat u. Äthanol (10 mM)	Malat (1 mM)
	Mol Glucose / g Protein / min			
Lactat(10 mM) (n)	8,49±0,46 (6)	10,66±0,83 ⁺⁺⁺ (6)		
Pyruvat(10 mM) (n)	3,67±0,36 (12)	1,87±0,25 ⁺⁺⁺ (12)	4,05±0,58 (4)	4,06±0,96 (6)
Malat(1 mM) (n)	1,67±0,59 (6)			
Oxalacetat(1 mM) (n)	1,73±0,32 (7)			

+++ p<0,001 n = Anzahl der Tiere

nen Pyruvat das gluconeogenetische Substrat bildete (vgl. Abb.7).

Da sich der Weg der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat auch hinsichtlich des Transportes von Oxalacetat durch die Mitochondrienmembran unterscheidet, sollte in der folgenden Versuchsreihe der Einfluß von Aminoxyacetat, einem Inhibitor der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, auf die Gluconeogenese untersucht werden (vgl. Abb.1a und Abb.1b, S.9 u. 10).

Wie Tabelle 7 zeigt, verursachte Aminoxyacetat eine signifikante Hemmung der Gluconeogenese aus Pyruvat. Überraschend war aber auch bei der Gluconeogenese aus Lactat eine Hemmung eingetreten, die noch ausgeprägter als bei Pyruvat war. Die Zugabe von Oxalacetat zeigte auch hier wieder den konträr verlaufenden Effekt. Im Falle von Pyruvat erniedrigte sich die Gluconeogenese unter dem zusätzlichen Einfluß von Oxalacetat abermals deutlich, während im Falle von Lactat klar erkennbar höhere Werte auftraten, wenn neben Aminoxyacetat auch noch Oxalacetat im Inkubationsmedium enthalten war. Wurde nun in Anwesenheit von Aminoxyacetat die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten durch Zugabe von Äthanol sichergestellt, so kam die hemmende Wirkung von Aminoxyacetat bei Pyruvat nicht zur Geltung. Unter diesen Bedingungen

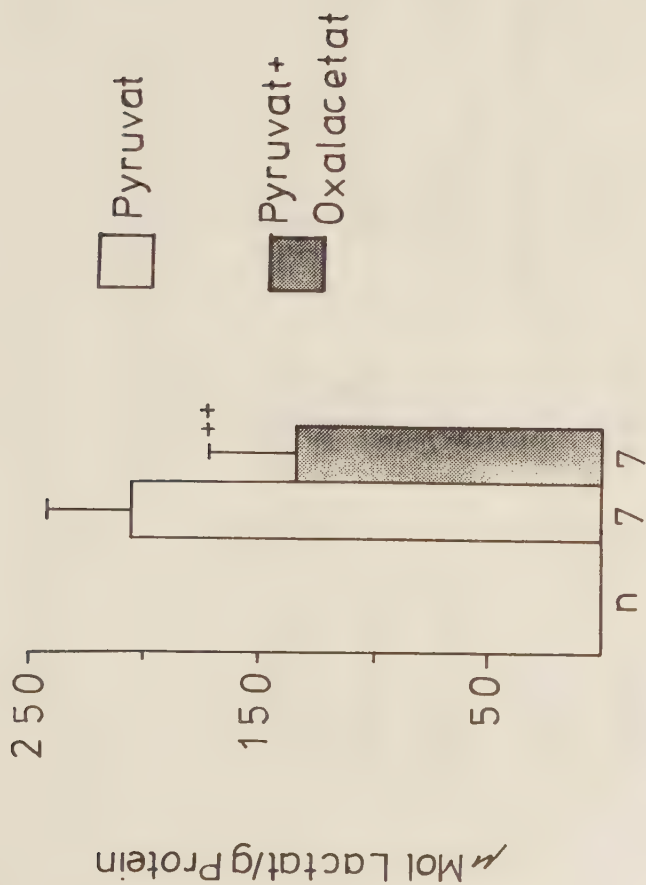


Abb. 7: Einfluß von Oxalacetat (1 mM) auf die Lactatbildung aus Pyruvat (10 mM) in Nierentubuli beim Huhn
 ++ p 0,01 n = Anzahl der Tiere

Tab.7 : Einfluß von Oxalacetat bzw. Äthanol auf die durch Aminoxyacetat (AOA) gehemmte renale Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat beim Huhn

Substrat	Kontrolle	AOA (0,2 mM)	AOA (0,2 mM) u. Oxalacetat (1 mM)	AOA (0,2 mM) u. Äthanol (10 mM)
	MMol Glucose / g Protein / min			
Lactat(10 mM) (n)	8,49±0,46 (6)	1,63±0,13 ⁺⁺⁺ (6)	6,96±1,10 ⁺ (6)	
Pyruvat(10 mM) (n)	3,67±0,31 (12)	2,76±0,32 ⁺⁺⁺ (12)	1,47±0,26 ⁺⁺⁺ (7)	4,49±0,53 ⁺ (5)
Oxalacetat(1 mM) (n)	1,73±0,32 (7)	1,18±0,28 ⁺⁺ (5)		

+ p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001

n = Anzahl der Tiere

erhöhte sich die Gluconeogenese aus Pyruvat wieder.

Des weiteren wurde untersucht, ob sich eine Blockierung des Citratzyklus unterschiedlich auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat auswirkt. Diese Frage war im Zusammenhang mit dem höheren Substratverbrauch bei Verwendung von Pyruvat gegenüber Lactat als Substrat interessant, da möglicherweise ein maßgeblicher Anteil des Pyruvats über den Citratzyklus metabolisiert wird. Zur Klärung dieser Frage wurde Malonat eingesetzt, das den Citratzyklus auf der Stufe der Succinat-Dehydrogenase hemmt. Wie Tabelle 8 zeigt, unterdrückte Malonat die Gluconeogenese weitgehend. Ein Unterschied zwischen Lactat und Pyruvat war dabei nicht zu beobachten.

Tab.8 : Einfluß von Malonat auf die renale Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat beim Huhn

Substrat (10 mM)	Kontrolle	Malonat (10 mM)
	$\mu\text{Mol Glucose} / \text{g Protein} / \text{min}$	
Lactat (n)	6,26 $\pm$ 1,23 (11)	0,43 $\pm$ 0,24 ⁺⁺⁺ (6)
Pyruvat (n)	3,19 $\pm$ 0,74 (6)	0,45 $\pm$ 0,38 ⁺⁺⁺ (6)

+++ $p < 0,001$

n = Anzahl der Tiere

3.2. Hepatische Gluconeogenese beim Huhn

Es wurden die Auswirkungen von Äthanol, g-Strophantin und Aminooxyacetat auf die hepatische Gluconeogenese untersucht. Die Werte in Tabelle 9 bestätigen auch den bei der Niere erhaltenen Befund, daß beim Huhn Lactat bei der Gluconeogenese ein wesentlich ergiebigeres Substrat darstellt als Pyruvat. In der Leber war der Unterschied der Glucoseausbeute zwischen Lactat und Pyruvat sogar noch ausgeprägter. Im Gegensatz zur Niere beeinflusste g-Strophantin die Gluconeogenese der Leber nicht. Äthanol zeigte zwar im Falle von Pyruvat einen steigenden Effekt auf die Glucosebildung, im Falle von Lactat konnte allerdings die hemmende Wirkung von Äthanol statistisch nicht gesichert werden. Schließlich ließ sich mit Aminooxyacetat nur die Gluconeogenese aus Lactat nicht jedoch die aus Pyruvat signifikant hemmen.

3.3. Renale Gluconeogenese beim Lamm

Wie Abbildung 8 zeigt, ist auch beim Lamm die Gluconeogenese aus Lactat allgemein höher als die aus Pyruvat. Im Gegensatz zum Huhn fällt jedoch auf, daß Lactat nicht mehr das ergiebige Substrat darstellt. Metabolite aus dem Citratzyklus und Fructose erreichten höhere

Tab.9 : Einfluß von g-Strophantin, Äthanol und Aminoxyacetat auf die hepatische Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat beim Huhn

Substrat (10 mM)	Mol Glucose / g Protein / min			
	Kontrolle	g-Strophantin (0,1 mM)	Äthanol (10 mM)	Aminoxyacetat (0,2 mM)
Lactat (n)	7,98 $\pm$ 0,98 (8)	8,02 $\pm$ 0,85 (8)		
Lactat (n)	8,78 $\pm$ 1,13 (6)		7,12 $\pm$ 1,19 (6)	
Lactat (n)	8,97 $\pm$ 1,32 (4)			1,71 $\pm$ 0,58 ⁺⁺⁺ (4)
Pyruvat (n)	1,30 $\pm$ 0,34 (6)	1,26 $\pm$ 0,32 (6)		
Pyruvat (n)	1,36 $\pm$ 0,35 (6)		3,00 $\pm$ 0,59 ⁺⁺⁺ (6)	
Pyruvat (n)	1,28 $\pm$ 0,41 (4)			1,21 $\pm$ 0,40 (4)

+++ p < 0,001

n = Anzahl der Tiere

Gluconeogeneseraten als Lactat.

Vergleicht man 2-7 Tage alte Lämmer mit 14-16 Wochen alten Lämmern (vgl. Abb.9), bei denen durch die Fütterung mit Milchaustauscher die Vormagenentwicklung unterdrückt wurde, so ist zu ersehen, daß bei älteren Tieren die Glucoseausbeute aus allen untersuchten Substraten höher ausfiel. Die Werte in Abbildung 8 zeigen, daß auch die Entwicklung des Vormagens einen Einfluß auf die renale Gluconeogenese ausübt. Mit Ausnahme von Pyruvat und Propionat war bei allen übrigen Substraten die Gluconeogeneserate bei Tieren mit entwickeltem Vormagensystem höher. Die Ausbildung des Vormagens war von einer pH-Wert-Zunahme des Harns begleitet. Bei den M-Lämmern hatte der Harn einen pH-Wert von 5,5-5,8, bei den HK-Lämmern lag er bei 7,8-8,4. Da nach Angaben in der Literatur (s.S.5) die renale Gluconeogenese durch acidotische Zustände gesteigert wird, hätte man unter diesem Aspekt mit der Ausbildung des Vormagens eher eine Abnahme der renalen Gluconeogenese erwartet. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Gluconeogenese von Nierentubuli untersucht. Zu diesem Zweck wurden Nierentubuli in Medien von unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Um vor allem im höheren pH-Bereich das Medium abzupuffern, wurde an Stelle des Krebs-Henseleit-Puffers Triätha-

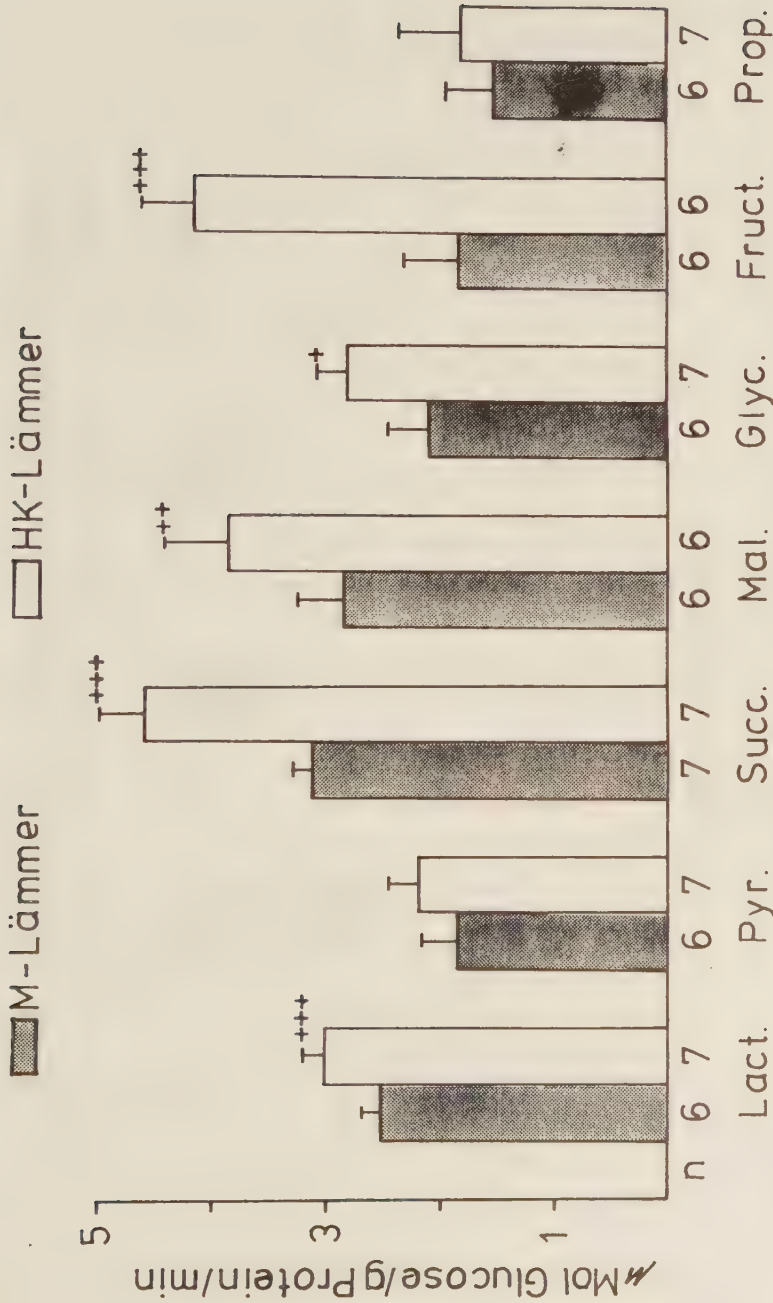


Abb. 8: Renale Gluconeogenese aus Lactat (Lact.), Pyruvat (Pyr.), Succinat (Succ.), Malat (Mal.), Glycerin (Glyc.), Fructose (Fruct.) und Propionat (Prop.) bei N- und HK-Lämmern
 Substratkonzentration: 10 mM
 n = Anzahl der Tiere
 + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$

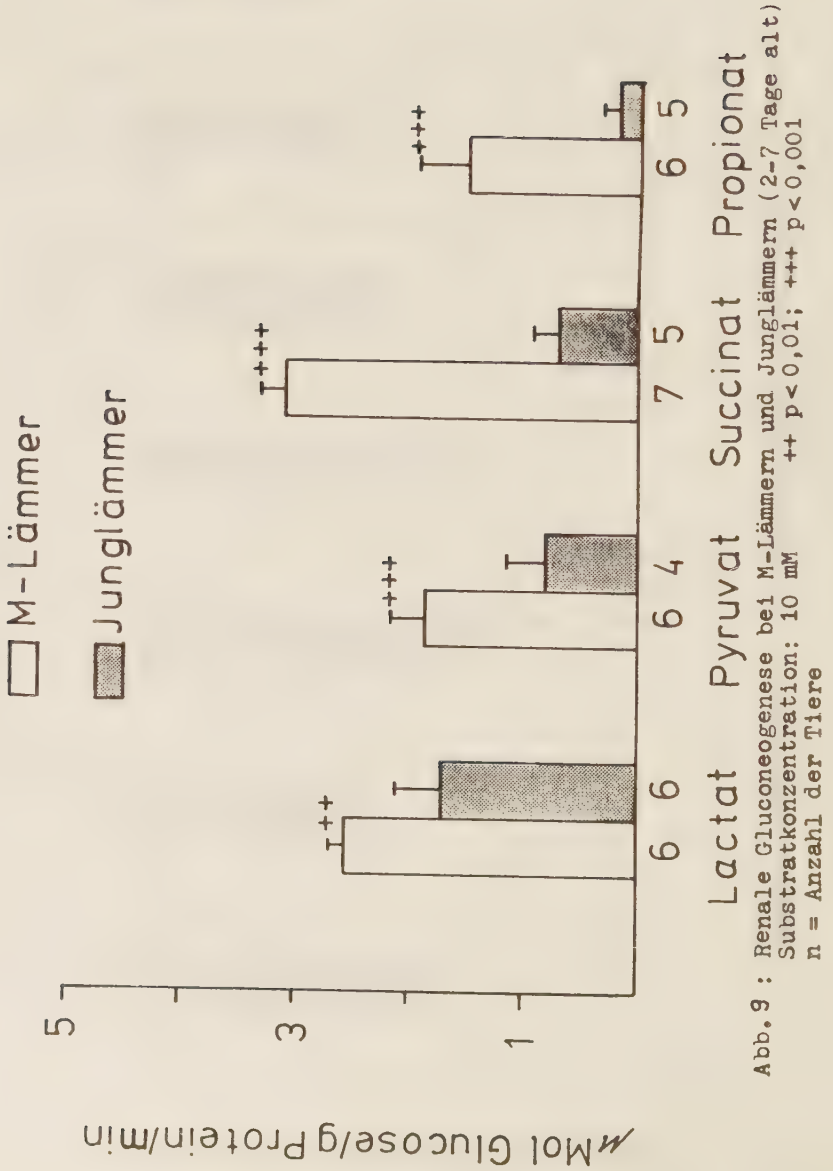


Abb. 9 : Renale Gluconeogenese bei M-Lämmern und Junglämmern (2-7 Tage alt)
 Substratkonzentration: 10 mM
 ++ p < 0,01; +++ p < 0,001
 n = Anzahl der Tiere

nolaminpuffer (50 mM) eingesetzt. Ansonsten wurden die Bedingungen eingehalten, die bei der Beschreibung der Methode ausgeführt wurden. Es wurden Substrate eingesetzt, auf die die Ausbildung des Vormagensystems entweder keinen (Pyruvat) oder einen großen Effekt (Succinat) auslöste.

Die Umstellung von Krebs-Henseleit-Puffer auf Triäthanolaminpuffer führte zu einer geringeren Glucoseausbeute (vgl. Tab.10). Den Werten ist aber eine deutliche Abhängigkeit der Gluconeogenese vom pH-Wert zu entnehmen. Bei beiden Substraten war die Gluconeogenese bei pH 6,8 bzw. 7,4 signifikant höher als bei pH 8,0.

Wie Vorversuche zeigten, hatte Äthanol keinen Einfluß auf die renale Gluconeogenese. Die beim Huhn mit Äthanol durchgeführten Untersuchungen waren daher beim Lamm nicht möglich.

g-Strophantin wirkte sich beim Lamm, ähnlich wie beim Huhn, auf die Gluconeogenese aus Pyruvat stimulierend ($p < 0,05$ bei HK- und $p < 0,01$ bei M-Lämmern) und auf die Gluconeogenese aus Lactat hemmend ($p < 0,001$) aus. Hemmend ($p < 0,001$) wirkte g-Strophantin auch auf die Gluconeogenese aus Succinat, Malat, Glycerin und Fructose. Dagegen hatte das Glycosid auf die Gluconeogenese aus Propionat keinen Einfluß (vgl. Abb.10). Ein Einfluß der Vormagenentwicklung auf den g-Strophantin-Effekt konnte dabei nur bei der Glucoseausbeute aus Fructose

Tab.10 : Einfluß des pH-Wertes auf die renale Gluconeogenese aus Succinat und Pyruvat beim Lamm

Substrat (10 mM)	pH 6,8	pH 7,4	pH 8,0
	Mol Glucose / g Protein / min		
Succinat (n)	2,28±0,41 (6)	2,38±0,46 (6)	1,06±0,24 ⁺⁺ (6)
Pyruvat (n)	1,26±0,21 (6)	1,22±0,18 (6)	0,74±0,14 ⁺⁺ (6)

⁺⁺ $p < 0,01$

n = Anzahl der Tiere

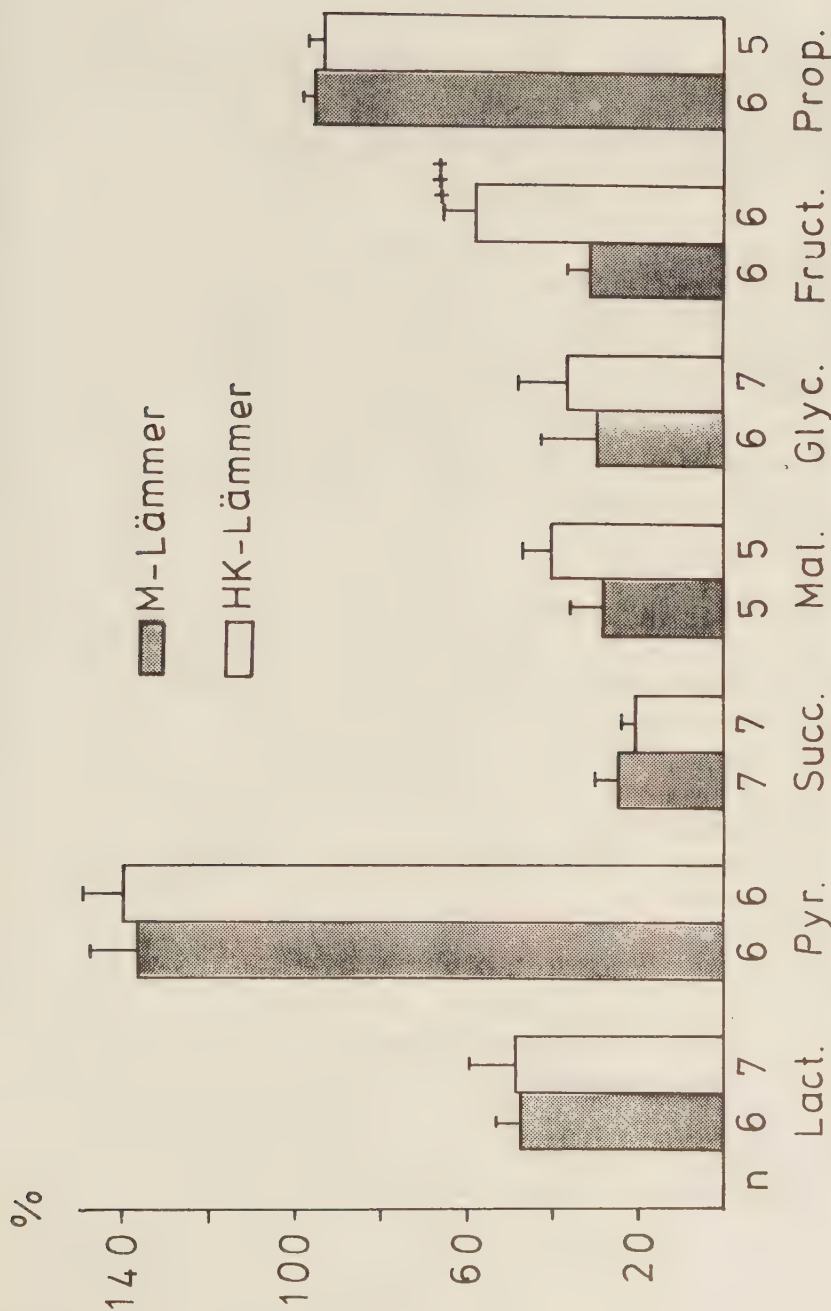


Abb. 10: Einfluß von g-Strophantin auf die renale Gluconeogenese aus Lactat (Lact.), Pyruvat (Pyr.), Succinat (Succ.), Malat (Mal.), Glycerin (Glyc.), Fructose (Fruct.) und Propionat (Prop.) bei M- und HK-Lämmern. Als Bezugspunkt (100%) wurde die jeweilige Gluconeogeneserate ohne Zusatz von g-Strophantin gewählt.
 Substratkonzentration: 10 mM
 n = Anzahl der Tiere

beobachtet werden. Bei den M-Lämmern war die Hemmung der Gluconeogenese aus Fructose durch g-Strophantin signifikant höher als bei den HK-Lämmern.

Die Auswirkungen von g-Strophantin auf die Lactat- und Pyruvatkonzentrationen waren nur gering. Wurde Pyruvat dem Inkubationsmedium zugegeben, so verhinderte g-Strophantin die Bildung von Lactat. Wurden Tubuli mit Lactat inkubiert, so hemmte g-Strophantin dessen Abbau zum Pyruvat (vgl. Tab.11). Die Effekte sind allerdings statistisch nicht signifikant.

Auf Grund der Tatsache, daß beim Schaf die Pep CK sich auf das Cytoplasma und die Mitochondrien aufteilt, interessierte schließlich die Frage, wie sich Aminooxyacetat auf die Gluconeogenese beim Lamm auswirkt. Wie Tabelle 12 zeigt, bedingte Aminooxyacetat in einer Konzentration von 0,2 mM nur beim Lactat eine signifikante Reduzierung der Glucoseausbeute, beim Pyruvat hingegen waren keine Veränderungen festzustellen.

Da auf Grund von Angaben aus der Literatur (vgl. 3.6) eine reziproke Beziehung zwischen Gluconeogenese und Aktivität der Na^+ - K^+ -sensitiven ATPase besteht, stellte sich die Frage, ob die bei HK- im Vergleich zu M-Lämmern erhöhte renale Gluconeogenese mit

Tab.11 : Einfluß von g-Strophantin auf die
Lactat- bzw. Pyruvatkonzentration
in Nierentubuli während der Inku-
bation (30 Minuten) beim Lamm

Substrat (10 mM)	Kontrolle	g-Strophantin (0,1 mM)
µMol Lactat / g Protein		
Pyruvat (n)	138,7±27,0 (7)	109,0±16,3 (7)
Substrat (10 mM)		
µMol Pyruvat / g Protein		
Lactat (n)	29,2±7,4 (7)	21,1±6,4 (7)

n = Anzahl der Tiere

Tab.12 : Einfluß von Aminoxyacetat auf die
renale Gluconeogenese aus Lactat
und Pyruvat beim Lamm

Substrat (10 ml)	Kontrolle	Aminoxyacetat (0,2 mM)
	$\mu\text{Mol Glucose} / \text{g Protein} / \text{min}$	
Lactat (n)	$2,52 \pm 0,40$ (5)	$1,06 \pm 0,35^{+++}$ (5)
Pyruvat (n)	$2,04 \pm 0,15$ (5)	$2,19 \pm 0,38$ (5)

+++ $p < 0,001$

n = Anzahl der Tiere

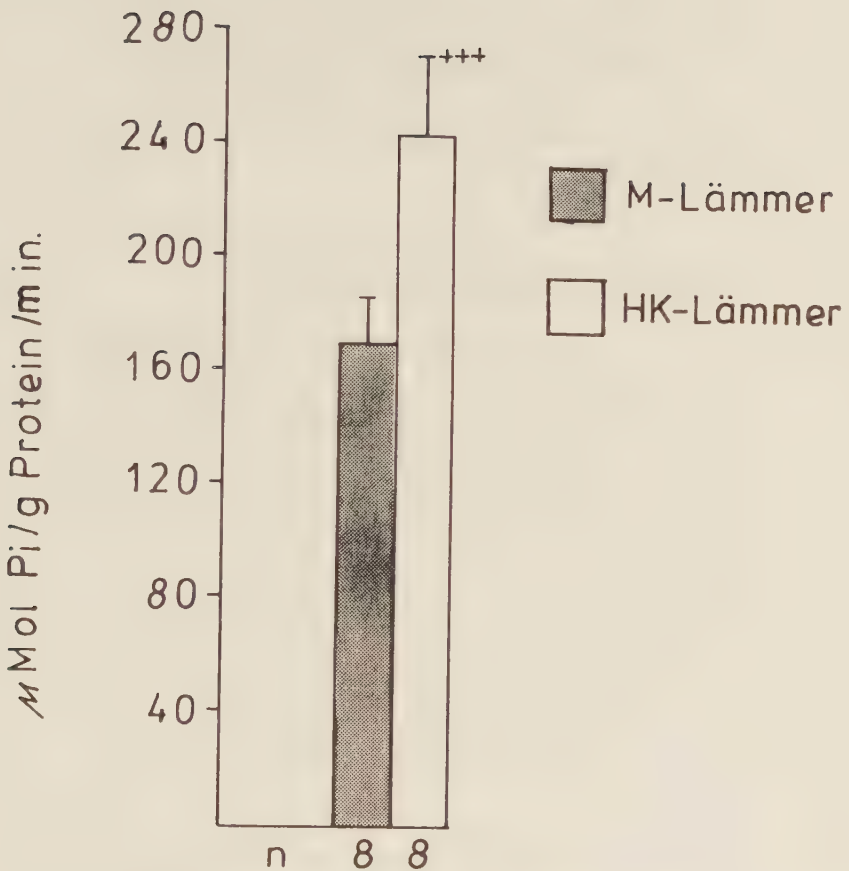


Abb.11: Aktivität der Na⁺-K⁺-sensitiven ATPase von M- und HK-Lämmern

P_i = anorganisches Phosphat

+++ p < 0,001

n = Anzahl der Tiere

einer Abnahme der Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -sensitiven ATPase einhergeht. Wie Abbildung 11 zeigt, konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Die Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -sensitiven ATPase war sogar bei den HK-Lämmern signifikant höher als bei den M-Lämmern.

3.4. renale Gluconeogenese beim Ferkel

Auch bei dieser Spezies war die Gluconeogenese aus Lactat wesentlich höher als aus Pyruvat. Orientierende Vorversuche zeigten außerdem, daß ähnlich wie beim Lamm, Äthanol keinen Einfluß auf die renale Gluconeogenese ausübt. Darüber hinaus veränderte auch g-Strophantin die Gluconeogenese aus Lactat, Pyruvat und Succinat nicht signifikant (vgl. Tab.13). Im Einklang mit diesem Befund steht das Ergebnis in Tabelle 14, wonach sich bei Anwesenheit von g-Strophantin im Inkubationsmedium die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat nicht veränderten.

Diese überraschenden Befunde veranlaßten Untersuchungen der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -sensitiven ATPase in der Nierenrinde. Es konnte dabei kein wesentlicher Unterschied in der Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -sensitiven ATPase gegenüber dem Lamm aufgezeigt werden. Die Aktivität dieses Transportenzyms war, verglichen mit der des Lammes, mit $182,3 \pm 56,2$ $\mu\text{Mol P}_i$ / g Protein / Minute (n=5) nur geringgradig niedriger.

Tab.13 : Einfluß von g-trophantin auf die
renale Gluconeogenese aus Lactat,
Pyruvat und Succinat beim Ferkel

Substrat (10 ml.)	Kontrolle	g-trophantin (0,1 mM)
	$\mu\text{Mol Glucose} / \text{g Protein} / \text{min}$	
Lactat (n)	$2,50 \pm 0,48$ (9)	$2,47 \pm 0,63$ (8)
Pyruvat (n)	$1,07 \pm 0,20$ (7)	$1,18 \pm 0,22$ (7)
Succinat (n)	$0,95 \pm 0,36$ (8)	$0,65 \pm 0,35$ (7)

n = Anzahl der Tiere

Tab.14 : Einfluß von g-Strophantin auf die Lactat- bzw. Pyruvatkonzentration in Nierentubuli während der Inkubation (30 Minuten) beim Ferkel

Substrat (10 mM)	Kontrolle	g-Strophantin (0,1 mM)
	µMol Lactat / g Protein	
Lactat (n)	2989,1±603,7 (4)	2932,8±499,8 (4)
Pyruvat (n)	72,4±16,0 (6)	68,3±14,1 (6)
Substrat (10 mM)		
	µMol Pyruvat / g Protein	
Lactat (n)	55,9±14,4 (6)	57,7±16,9 (6)
Pyruvat (n)	466,9±134,2 (4)	462,0±146,5 (4)

n = Anzahl der Tiere

4. Diskussion

Solange man sich bei Studien über die Gluconeogenese auf die Ratte als Spezies konzentrierte, bestand keine Veranlassung zu der Annahme, daß zwischen Lactat und Pyruvat als Substrate für die Gluconeogenese wesentliche Unterschiede im Hinblick auf das gluconeogenetische Geschehen bestehen. Das weitgehend einheitliche diesbezügliche Verhalten von Lactat und Pyruvat, z.B. bei hormonellen Einflüssen (52, 60), beim Hunger (38), beim Diabetes (3) und gegenüber Fettsäuren (40, 59) stimmte auch mit den Vorstellungen überein, die das gluconeogenetische Stoffwechselschema wiedergibt.

Die Versuche in dieser Arbeit bestätigen aber die Befunde anderer Autoren aus den letzten Jahren, daß zwischen Lactat und Pyruvat erhebliche Unterschiede in der Gluconeogenese bestehen können (vgl.S. 7). Bei der Ratte ergibt die Gluconeogenese aus Pyruvat in der Regel höhere Werte als aus Lactat (25, 39). Höhere Raten für die Gluconeogenese aus Lactat gegenüber Pyruvat wurden aber bei anderen Tierarten aufgezeigt wie z.B. bei der Taube (39) und dem Meerschweinchen (57). Auch bei allen Spezies, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, war die Gluconeogenese aus Lactat höher als die aus Pyruvat. Die höhere Gluconeogenese aus Pyruvat gegenüber Lactat scheint demnach eher die Ausnahme als der Regelfall zu sein.

Vergleicht man die gluconeogenetischen Ausbeuten aus Lactat und Pyruvat mit der Verteilung der pep CK in der Zelle, so ergibt sich daraus kein Hinweis, daß die Lokalisierung der pep CK die Ursache der unterschiedlichen Glucosebildung aus Lactat und Pyruvat darstellt. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Arten ist die pep CK entweder fast ausschließlich in den Mitochondrien (Huhn) oder in den Mitochondrien und im Cytoplasma (Schaf, Schwein) lokalisiert.

Einen entscheidenden Faktor für die höhere Gluconeogenese aus Lactat stellt sicherlich die Verfügbarkeit des cytoplasmatischen Wasserstoffs dar. Dies geht aus den Untersuchungen hervor, in denen Nierentubuli außer mit dem Substrat zusätzlich mit Äthanol inkubiert wurden. Ähnliche Untersuchungen mit Äthanol wurden an der Leber verschiedener Spezies wiederholt durchgeführt (41, 58). Von diesen Untersuchungen her ist bekannt, daß die metabolischen Auswirkungen von Äthanol durch die Elektronen, die bei der Oxidation von Äthanol freigesetzt werden, zustande kommen. Stöchiometrisch äußert sich die Metabolisierung von Äthanol in einer Zunahme des Lactat/Pyruvat-Quotienten, die durch Erhöhung der Lactatkonzentration zustande kommt. Der stimulierende Effekt des Äthanols auf die Gluconeogenese aus Pyruvat wird darauf zurückgeführt, daß dessen Oxidation die Elektronen bereitstellt, die für die Reduktion von 1,3-Diphosphoglycerat benötigt werden. Offensicht-

lich ist dieser Schritt nicht bei allen Spezies durch die Reduktionsäquivalente limitiert. Bei der Maus und bei der Ratte steigerte Äthanol die Gluconeogenese aus Pyruvat nicht (41, 43).

Die Hemmung der Gluconeogenese aus Lactat durch Äthanol ist nach Angaben aus der Literatur offensichtlich nicht speziesabhängig (43). Der hemmende Effekt des Äthanols kommt dadurch zustande, daß das NADH, das bei der Oxidation von Äthanol entsteht, den Übergang von Lactat zu Pyruvat hemmt (41). Für die Niere wurden bisher keine Effekte in dieser Richtung beschrieben. In diesem Zusammenhang wird die Meinung vertreten (22,43), daß Äthanol wegen der geringen Aktivität der Alkoholdehydrogenase in der Niere keine metabolischen Auswirkungen zur Folge hat. Dies hat augenscheinlich für die Niere des Huhnes, die eine relativ hohe Aktivität der Alkoholdehydrogenase aufweist (63), keine Gültigkeit.

Die Bildung des Lactats aus Pyruvat und die Hemmung der Oxidation von Lactat in Anwesenheit von Äthanol sprechen dafür, daß Äthanol in der Niere des Huhnes denselben metabolischen Effekt auslöst, wie er in der Leber bei anderen Tierarten beschrieben wird. Der Befund, daß Äthanol die Gluconeogenese aus Pyruvat stimuliert, zeigt ausserdem, daß die Niere des Huhnes zu den gluconeogenetischen Organen zählt, bei denen die Reduktionsäquivalente die Reaktionsgeschwindigkeit von 1,3-Diphosphoglycerat zum Glycerinaldehyd-3-Phosphat durch ihre Verfügbarkeit beein-

flussen können.

Die Bedeutung der Reduktionsäquivalente für die renale Gluconeogenese aus Pyruvat ist auch aus den Versuchen mit Oxalacetat und Malat zu ersehen. Oxalacetat wird, da es nicht durch die Mitochondrienmembran transportiert werden kann, zunächst einen metabolischen Effekt im Cytoplasma ausüben. Hier kann es entweder zum Malat reduziert oder zum Aspartat transaminiert werden. Die Abnahme von Lactat unter dem Einfluß von Oxalacetat (vgl. Abb.7) in Nierentubuli des Huhnes ist als Hinweis dafür zu werten, daß die oxidierende Wirkung des Oxalacetats im Cytoplasma zum Tragen kommt. Die hemmende Wirkung von Oxalacetat auf die Gluconeogenese aus Pyruvat wäre demnach in der Weise zu deuten, daß die limitierenden Reduktionsäquivalente für die Gluconeogenese aus Pyruvat noch weiter abfallen und damit die Gluconeogenese auf der Stufe von 1,3-Diphosphoglycerat gehemmt wird. Unterstützt wird diese Annahme durch den Befund, daß Athanol die durch Oxalacetat bewirkte Hemmung der Gluconeogenese rückgängig machte. Im Gegensatz zu Oxalacetat hemmte Malat, welches das cytoplasmatische Reduktionspotential nicht vermindert, die Gluconeogenese nicht.

Ohne zusätzlichen meßbaren Effekt war auch die Zugabe von Oxalacetat zum Inkubationsmedium bei der Gluconeogenese aus Lactat. In diesem Fall wurden die cytoplasmatischen Reduktionsäquivalente offensichtlich nicht so entscheidend durch

Oxalacetat beeinflusst, daß deren Verfügbarkeit sich limitierend auf die Gluconeogenese auswirkte.

Bei den Versuchen über die Stimulierung der Gluconeogenese aus Pyruvat durch Äthanol fällt auf, daß Pyruvat auch in Anwesenheit von Alkohol immer noch nicht die Rate der Gluconeogenese aus Lactat erreicht. Daraus muß geschlossen werden, daß das Reduktionspotential nicht die ausschließliche Ursache für die unterschiedliche gluconeogenetische Kapazität von Lactat und Pyruvat darstellt, oder, daß auch die durch die Alkoholdehydrogenase freigesetzten Reduktionsäquivalente nicht ausreichend hoch sind. SÖLING und KREBS, die vergleichbare Untersuchungen an der Leber vom Meerschweinchen bzw. von der Taube durchführten (57,41), vertreten die Meinung, daß noch andere Faktoren die unterschiedliche gluconeogenetische Ausbeute aus Lactat und Pyruvat bestimmen. Sie wurden von ihnen aber nicht präzisiert. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß, ähnlich wie Äthanol, auch g-Strophantin beim Huhn die Gluconeogenese aus Pyruvat erhöhte und die aus Lactat verringerte. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur Wirkung von g-Strophantin auf die Gluconeogenese bei der Ratte, wo sich die Gluconeogenese aus den Substraten, die nicht aus dem Citratzyklus stammen in Gegenwart von g-Strophantin, erhöhte. Da sich beim Lamm ebenfalls g-Strophantin unterschiedlich auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat auswirkte, scheint

diese Wirkung des g-Strophantins keine Ausnahme zu sein. Unklar bleibt jedoch, warum beim Ferkel g-Strophantin keinen Effekt auf die Gluconeogenese ausübte. Bemerkenswert ist außerdem der Befund, daß sich die Effekte von Äthanol und g-Strophantin bei der Gluconeogenese aus Pyruvat addierten. Die Anwesenheit dieser beiden Substanzen im Inkubationsansatz erbrachte Glucoseausbeuten, die annähernd denen des Lactats entsprachen. Auf Grund dieses Befundes liegt die Vermutung nahe, daß g-Strophantin in einen weiteren Regulationsmechanismus eingreift, der das Ausmaß der Gluconeogenese aus Pyruvat mitentscheidet. Daß g-Strophantin nicht auf dieselbe Weise wie Äthanol in das gluconeogenetische Geschehen einwirkt, geht auch daraus hervor, daß die Anwesenheit von g-Strophantin nicht wie Äthanol zu einer Anhebung des Lactatspiegels aus Pyruvat führte.

Eine Deutung des g-Strophantineffektes ist wegen der komplexen Wirkung des Glycosids im Stoffwechsel problematisch. FRIEDRICHS und SCHONER (19) schlossen aus ihren umfangreichen Untersuchungen, daß sich bei der Ratte durch Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -sensitiven ATPase ein höherer Energiestatus in der Zelle ausbildet, der der Gluconeogenese zu Gute kommt. Es muß aber bezweifelt werden, ob diese Vorstellung auch auf das Huhn und das Lamm übertragen werden kann. Einmal war die Wirkung von g-Strophantin auf die Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat im Gegensatz zur Ratte nicht einheitlich. Zum anderen ergaben die

Untersuchungen über den ATP-Gehalt der Nierentubuli nach Inkubation mit g-Strophantin keinen Hinweis für eine unterschiedliche Auswirkung von g-Strophantin auf den ATP-Gehalt in Anwesenheit von Lactat bzw. Pyruvat. Schließlich zeigten die Versuche beim Lamm, daß auch bei Tieren mit ausgebildetem Vormagensystem sowohl die gluconeogenetische Kapazität wie auch die Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -sensitiven ATPase anstieg. Konkurrieren $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -sensitive ATPase und Gluconeogenese um den ATP-Vorrat in der Zelle, so sollte es bei einem Anstieg der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -sensitiven ATPase nicht auch noch gleichzeitig zu einer Zunahme der Gluconeogenese kommen. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß g-Strophantin sich hemmend auf die Pyruvat-Dehydrogenase (27), die die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat katalysiert, auswirkt. Da dieser Schritt eine Konkurrenzreaktion zur Gluconeogenese darstellt, würde durch die Blockierung dieser Reaktion vermehrt Pyruvat der Gluconeogenese zugeführt werden. Daß beim Einsatz von Pyruvat ein wesentlicher Anteil des eingesetzten Pyruvats auf anderen Wegen als den der Gluconeogenese umgesetzt wird, geht aus der Bilanz des Pyruvatumsatzes hervor. Aus ihr wird ersichtlich, daß nicht, wie auf Grund von theoretischen Berechnungen zu erwarten wäre, 2 Mol, sondern annähernd 3 Mol umgesetzt wurden, um 1 Mol Glucose aufzubauen.

In diesem Zusammenhang wäre dann freilich zu klären, warum g-Strophantin sich auf die Gluconeogenese aus Lactat nicht auch stimulierend auswirkt.

Hier zeigen aber die Berechnungen der verbrauchten Lactatmenge, daß die Gluconeogenese in wesentlich geringerem Umfang von Nebenreaktionen begleitet ist. Für den Aufbau von 1 Mol Glucose wurden 3 Mol Lactat umgesetzt, eine Menge, die dem theoretischen Wert schon sehr nahe kommt. Außerdem hemmte, ähnlich wie Äthanol, g-Strophantin die Oxidation von Lactat, so daß möglicherweise die Hemmung der Gluconeogenese aus Lactat durch Äthanol bzw. g-Strophantin über denselben Mechanismus abläuft.

Ein entscheidender Unterschied in der Gluconeogenese zwischen Huhn und Lamm bestand in der Auswirkung von Aminoxyacetat. Während beim Huhn Aminoxyacetat die renale Gluconeogenese aus Lactat wie auch aus Pyruvat hemmte, war beim Lamm nur die Gluconeogenese aus Lactat verringert worden. Dieses Ergebnis beim Lamm läßt sich direkt mit den Werten vergleichen, die LONGSHAW et al. (46) bei Versuchen mit Meerschweinchen, einer Spezies, die ähnlich wie das Lamm eine mitochondrial und cytoplasmatisch ausgebildete Pep CK hat, erhielten. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Glutam-Oxalacetat-Transaminase nur bei der Gluconeogenese aus Lactat, hingegen nicht aus Pyruvat eine Rolle spielt. Die Ergebnisse, die bei Anwesenheit von Aminoxyacetat im Inkubationsmedium beim Huhn erzielt wurden, decken sich nicht mit dem Bild, das für Spezies mit ausschließlich mitochondrialer Pep CK entwikk-

kelt wurde. Danach hätte man bei der Gluconeogenese aus Pyruvat, nicht aber aus Lactat in Anwesenheit von Aminoxyacetat eine Abnahme erwartet (vgl. Abb.1a). Die durch Aminoxyacetat noch in höherem Maße gehemmte Gluconeogenese aus Lactat spricht dafür, daß auch bei der Gluconeogenese aus Lactat die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase beteiligt ist. Die Gründe für dieses Verhalten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender untersucht.

Des weiteren waren zwischen Huhn und Lamm auch Unterschiede in den altersbedingten Veränderungen der Gluconeogenese festzustellen. Beim Huhn erhöhte sich mit zunehmendem Alter nur die Gluconeogenese aus Succinat, beim Lamm waren auch entsprechende Veränderungen bezüglich der Gluconeogenese aus Substraten Lactat, Pyruvat und Propionat zu beobachten. Der Befund beim Huhn überrascht nicht, da Studien über die Gluconeogenese zeigten, daß die Schlüsselenzyme, die beim gluconeogenetischen Weg von Lactat und Pyruvat eingeschaltet sind, nämlich Pyruvatcarboxylase und Pep CK, und auch die hepatische Gluconeogenese bereits pränatal Werte erreichen, die denen der erwachsenen Tiere entsprechen (48, 16). Von Untersuchungen an der Leber des Lammes ist bekannt, daß zwar die Gluconeogenese pränatal funktionstüchtig ist, aber postnatale Impulse zu einer ausgeprägten Steigerung der Gluconeogenese führen (4). Eine substratspezifische Zunahme der hepatischen

Gluconeogenese mit fortschreitendem Alter konnte in jüngster Zeit auch an isolierten Hepatozyten von Lämmern aufgezeigt werden (33). Da bei diesen Untersuchungen nur Tiere mit unterschiedlichem Alter, aber nicht gleichaltrige Tiere mit unterschiedlicher Vormagenentwicklung verglichen wurden, läßt sich aus diesen Werten der Einfluß der Vormagenentwicklung auf die Gluconeogenese nicht quantifizieren. Die vorliegenden Untersuchungen lassen deutliche substratspezifische Unterschiede erkennen, welche durch das Alter oder durch die Vormagenentwicklung bedingt sind. So erhöhte sich die Gluconeogenese aus Pyruvat und Propionat nicht mit der Ausbildung des Vormagensystems, sondern mit fortschreitendem Alter. Der Befund, daß die Vormagenentwicklung keinen Einfluß auf die renale Gluconeogenese aus Propionat ausübt, überrascht, da bekannt ist, daß bei Schafen mit entwickeltem Vormagensystem in der Leber bis zu 50% der Substratbereitstellung durch Propionat erfolgt (4). Allerdings ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß beim Wiederkäuer die Propionatkonzentration des Blutes, vom Portalblut abgesehen, sehr niedrig ist. Die Zunahme der renalen Gluconeogenese mit der Ausbildung des Vormagensystems ist vor allem deswegen bemerkenswert, weil sie trotz des Anstiegs des pH-Wertes des Harns stattfindet. Auf Grund der vermehrten renalen Protonensekretion bei noch nicht wiederkäuenden M-Lämmern sollte die Gluconeogenese höher liegen als bei den gleichaltrigen wiederkäuenden HK-Lämmern. Die

Versuche an isolierten Nierentubuli zeigten dann auch, daß die Gluconeogenese beim Schaf ebenfalls unter dem Einfluß des pH-Wertes steht. Bei in vivo Untersuchungen liegen diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse vor. KAUFMAN und BERGMAN (37) konnten keinen Anstieg der Glucoseabgabe aus der Niere unter acidotischen Zuständen nachweisen. Hingegen beobachteten MC INTOSH et al. (47) bei Acidose einen Anstieg der Glucoseabgabe aus der Niere ins Blut um den dreifachen Betrag bei einer exakteren Versuchsdurchführung, so daß die Vermutung nahe liegt, daß auch das Schaf auf pH-Veränderungen des Harns mit einer gesteigerten Gluconeogenese reagiert.

Damit bleibt die Frage zu beantworten, warum sich die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration des Harns bei der Entwicklung des Vormagensystems nicht auf die renale Gluconeogenese auswirkte. Möglicherweise wird dieser Effekt von anderen Faktoren, wie z.B. der Stimulierung der Gluconeogenese durch den abfallenden Blutzucker oder endokrine Umstellungen, überspielt.

5. Zusammenfassung

Untersuchungen über die Gluconeogenese an isolierten Nierentubuli zeigten, daß bei Huhn, Lamm und Ferkel die Gluconeogenese aus Lactat höher ist als aus Pyruvat. Versuche mit Äthanol, Oxalacetat und Malat deuten darauf hin, daß in der Hühnerniere die Verfügbarkeit der cytoplasmatischen Reduktionsäquivalente einen limitierenden Faktor der Gluconeogenese aus Pyruvat darstellt.

Eine altersbedingte Zunahme der Gluconeogenese konnte beim Huhn nur aus Succinat beobachtet werden. Verglichen mit 2-7 Tage alten Lämmern war dagegen die Gluconeogenese aus Pyruvat, Lactat, Fructose und Propionat bei 14-16 Wochen alten Lämmern signifikant höher. Eine Erhöhung der Gluconeogenese aus Fructose, Lactat, Malat, Glycerin und Succinat, aber nicht aus Pyruvat und Propionat wurde mit der Ausbildung des Vormagensystems beobachtet. Dieses Ergebnis wurde durch einen Vergleich der renalen Gluconeogenese von 14-16 Wochen alten Lämmern festgestellt, welche sich infolge andersgearteter Fütterung in der Ausbildung des Vormagensystems unterschieden.

Versuche mit Aminooxyacetat weisen darauf hin, daß in der Hühnerniere die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Reaktion bei der Gluconeogenese sowohl aus Lactat wie auch aus Pyruvat von Bedeu-

tung ist. In der Niere des Lammes hingegen scheint auf Grund der Ergebnisse mit Amino-oxyacetat die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase nur bei der Gluconeogenese aus Lactat eine Rolle zu spielen.

g-Strophantin verringerte mit Ausnahme von Pyruvat (Huhn, Lamm) und Propionat (Lamm) die Gluconeogenese aus allen übrigen Substraten (Lamm: Lactat, Glycerin, Fructose, Succinat, Malat; Huhn: Lactat, Fructose, Succinat). Wurde Pyruvat als gluconeogenetisches Substrat eingesetzt, so erhöhte sich die Gluconeogenese unter dem Einfluß von g-Strophantin. Bei Propionat verursachte g-Strophantin keinen Effekt. Ebenfalls keinen Effekt auf die Gluconeogenese aus Lactat, Pyruvat und Succinat hatte g-Strophantin in Nierentubuli des Ferkels.

Summary

Studies on gluconeogenesis revealed that more glucose is formed out of lactate than out of pyruvate in isolated kidney tubulus from chicken, lamb and pig. The experiments performed with ethanol, oxalacetate and malate demonstrated that in chicken kidney the gluconeogenesis from pyruvate is limited by the reducing equivalents available in the cytoplasm.

In chicken, an age dependent increase of gluconeogenesis was only observed with succinate. Compared with 2-7 days old lambs, the renal glucose formation out of pyruvate, lactate, fructose and propionate was stimulated in 14-16 weeks old lambs. An enhancement of glucose formation from fructose, lactate, malate, glycerol and succinate, but not from pyruvate and propionate, was followed by the development of the rumen. This result was established by comparing the renal gluconeogenesis from 14-16 weeks old lambs, which differed in the developmental stage of the rumen, as a consequence of different feeding.

Experiments performed with aminooxyacetate revealed that in chicken kidney the reaction of glutamate-oxalacetate-transaminase is involved in gluconeogenesis from lactate as well as from pyruvate. On the basis of results received with aminooxyacetate, in lamb the reaction catalyzed

by glutamate-oxalacetate-transaminase seems to be of importance for gluconeogenesis from lactate, but not from pyruvate.

With the exception of pyruvate (chicken, lamb) and propionate (lamb), *g*-strophantin reduced gluconeogenesis from all the other substrates (lamb: lactate, glycerol, fructose, succinate, malate; chicken: lactate, fructose, succinate). Glucose formation from pyruvate was stimulated under the influence of *g*-strophantin. Concerning propionate, no effect of *g*-strophantin was observed. No influence on gluconeogenesis from lactate, pyruvate and succinate was exerted by *g*-strophantin in pig kidney tubulus.

6. Literaturverzeichnis

1. Albers, R.W.
Ann. Rev. Biochem. 36, 727, (1967)
2. Arinze, I.J., A.J. Garber and R.W. Hanson
J. Biol. Chem. 248, 2266, (1973)
3. Ashmore, J., S.R. Wagle and T. Uete
Adv. Enzyme Regul. 2, 101, (1964)
4. Ballard, F.J. and I.T. Oliver
Biochem. J. 95, 191, (1965)
5. Ballard, F.J., R.W. Hanson and D.S. Kronfeld
Fed. Proc. 28, 218, (1969)
6. Bargoni, N., M.A. Grillo, M.T. Rinaudo und
T. Fossa
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349,275,(1968)
7. Benoy, M.P. and K.A.C. Elliott
Biochem. J. 31, 1268, (1937)
8. Bergman, E.N.
The Cornell Veterinarian 63, 341, (1973)
9. Bergmeyer, H.U., E. Bernt, F. Schmidt, H.Stork
in Methoden der enzymatischen Analyse S. 1163
Herausgeber H.U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim 1970
10. Berry, M.N. and D.S. Friend
J. Cell. Biol. 43, 507, (1969)
11. Charney, A.N., P. Silva, A. Besarab and
F.H. Epstein
Amer. J. Physiol. 227, 345, (1974)
12. Czok, R. und W. Lamprecht
in Methoden der enzymatischen Analyse S. 1407
Herausgeber H.U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim 1970

13. Dakin, H.D.
Physiol. Rev. 1, 394, (1921)
14. Elliott, K.A.C. and E.F. Schroeder
Biochem. J. 28, 1920, (1934)
15. Exton, J.H. and C.R. Park
J. Biol. Chem. 242, 2622, (1967)
16. Felicioli, R.A., F. Gabrielli and C.A. Rossi
Eur. J. Biochem. 3, 19, (1967)
17. Fiske, C.H. and Y. Subba Row
J. Biol. Chem. 66, 375, (1925)
18. Fox, M., S. Thier, L. Rosenberg and S. Segal
Biochim. Biophys. Acta 79, 167, (1964)
19. Friedrichs, D. and W. Schoner
Biochim. Biophys. Acta 304, 142, (1971)
20. Froesch, E.R., J. Ashmore and A.E. Renold
Endocrinology 62, 614, (1958)
21. Fülgraff, G., H. Nünemann and D. Sudhoff
Naunyn-Schmiedbergs Arch.Pharmacol. 273,86,(1972)
22. Madison, L.L.
in " Alkohol und Leber " S. 33
ed. W. Geroh, K. Sideringer, H. Hennekenser
Freiburg im Breisgau 1970
23. Gevers, W.
Biochem. J. 103, 141, (1967)
24. Goodman, A.D., R.E. Fuisz and C.F. Cahill jr.
J. Clin. invest. 45, 612, (1966)
25. Guder, W., W. Wiesner, B. Stukowski und
O. H. Wieland
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352,1319,(1971)
26. Guder, W. und U. Schmidt
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 355,273,(1974)

27. Guder, W. und B. Stukowski
Internationales Symposium
" Diuretica in Forschung und Klinik "
Bürgenstock, Schweiz 1975 (im Druck)
28. György, P., W. Keller und Th. Brehme
Biochem. Z. 200, 356, (1928)
29. Helmraath, T.A. and L.L. Bieber
Amer. J. Physiol. 227, 1306, (1974)
30. Henning, H.V., B. Stumpf, B. Ohly und
W. Seubert
Biochem. Z. 344, 274, (1966)
31. Hohorst, H.J.
in Methoden der enzymatischen Analyse S.1425
Herausgeber H.U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim 1970
32. Hunter, F.
in Methods in Enzymology II (1955) p 610
ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan
Academic Press 1955
33. Jarrett, I.G., M.G. Clark and O.H. Filsell
Biochem. J. 156, 671, (1976)
34. Joseph, P.K. and K. Subrahmanyam
Arch. Biochem. Biophys. 127, 288, (1968)
35. Kamm, D.E., R.E. Fuisz, A.D. Goodman and
C.F. Cahill jr.
J. Clin. Invest. 46, 1172, (1967)
36. Kamm, D.E. and C.F. Cahill jr.
Amer. J. Physiol. 216, 1207, (1969)
37. Kaufman, C.F. and E.N. Bergman
Amer. J. Physiol. 221, 967, (1971)
38. Krebs, H.A., D.A.H. Bennett, P. de Gasquet,
T. Gascoyne and T. Yoshida
Biochem. J. 86, 22, (1963)

39. Krebs, H.A. and T. Yoshida
Biochem. J. 89, 398, (1963)
40. Krebs, H.A., R.N. Speake and R. Hems
Biochem. J. 94, 712, (1965)
41. Krebs, H.A., T. Gascoyne and B.M. Notton
Biochem. J. 102, 275, (1967)
42. Krebs, H.A.
in: Renaler Transport und Diuretica S.1
Herausgeber K. Thureau und H. Jahrmärker
Springer Verlag 1969
43. Krebs, H.A., R.A. Freedland, R. Hems
and M. Stubbs
Biochem. J. 112, 117, (1969)
44. Krebs, H.A.
Adv. Enzyme Regul. 1, 385, (1963)
45. Lamprecht, W. und I. Trautschold
in Methoden der enzymatischen Analyse S.2029
Herausgeber H.U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim 1970
46. Longshaw, I.D., N.L. Bowen and C.I. Pogson
Eur. J. Biochem. 25, 366, (1972)
47. Mc. Intosh, G.H. Filsell and I.G. Jarrett
Aust. J. Biol. Sci. 26, 1389, (1973)
48. Nelson, P., G. Yarnell and S.R. Wagle
Arch. Biochem. Biophys. 114, 543, (1966)
49. Nishiitsutsuji-Uwo, J.M., B.D. Ross and H.A. Krebs
Biochem. J. 103, 852, (1967)
50. Nordlie, R.C. and H.A. Lardy
J. Biol. Chem. 238, 2259, (1963)
51. Pincussen, L.
Chemie der Niere und Harnwege
in Handbuch der Biochemie 2.Aufl. Vol.5, 437 (1925)

52. Ross, B.D., R. Hems and H.A. Krebs
Biochem. J. 102, 942, (1967)
53. Russel, J.A. and A.E. Wilhelmi
J. Biol. Chem. 140, 747, (1941)
54. Schoner, W.
Angew. Chem. 83, 947, (1971)
55. Siegel, S.
Nonparametric Statistics p.116
ed. Mc. Graw-Hill Book Company (1956)
56. Smith, R.M. and W.S. Osborne-White
Biochem. J. 124, 867, (1971)
57. Söling, H.D., B. Willms, J. Kleineke
and M. Gehlhoff
Eur. J. Biochem. 16, 289, (1970)
58. Söling, H.D., J. Kleineke, B. Willms,
G. Janson and A. Kuhn
Eur. J. Biochem. 37, 233, (1973)
59. Struck, E., J. Ashmore und O. Wieland
Biochem. Z. 343, 107, (1965)
60. Struck, E., J. Ashmore and O. Wieland
Adv. Enzyme Regul. 4, 219, (1966)
61. Teng, C.T.
Arch. Biochem. Biophys. 48, 415, (1954)
62. Utter, M.F.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 72, 451, (1959)
63. Wartburg v., J.P. und H. Aebi
in Alkohol und Coffein
Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung 17, 1, (1970)
64. Weidemann, M.J. and H.A. Krebs
Biochem. J. 112, 149, (1969)

- 65. Williamson, J.R., R.A. Kreisberg and
P.W. Felts
Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 247, (1966)
- 66. Wittmann, J. und E. Weigl
pers. Mitteilung
- 67. Zahlten, R.N., N.M. Keer, F.W. Stratman
and H.A. Lardy
Arch. Biochem. Biophys. 161, 528, (1974)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.D.Giesecke für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Dr.J.Wittmann möchte ich für die zahlreichen Anregungen bei der Planung und Auswertung der Versuche, sowie für die allzeit freundliche Beratung meinen großen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 28. August 1947 wurde ich, Frank Kornbichler, in Mößling, Landkreis Mühldorf, als Sohn des Lehrers Alfred Kornbichler und seiner Ehefrau Franziska, geb. Dettendorfer, geboren.

Am 23. Juli 1968 erhielt ich das Reifezeugnis des Ignaz-Günther-Gymnasiums in Rosenheim.

Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Sommersemester 1969. Am 7.1.1975 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Seit Februar 1975 bin ich am Institut für Physiologie, physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.



